

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

Mention "SCIENCE"

par

BAU Hwei Ming

SUJET :

**Etude de la dénaturation et de la digestion enzymatique
"in vitro" des fractions protéiques du Soja**

Soutenue publiquement le 11 Juillet 1972 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président : M. C. ALAIS

Examineurs : MM. R. GAY
G. DEBRY



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551928_0003

UDART & CLÉMENT
RELIEURS

11, Rue Sainte-Anne, 11
Téléph. 52.80.09 - NANCY

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

Mention "SCIENCE"

par

BAU Hwei Ming

SUJET :

**Etude de la dénaturation et de la digestion enzymatique
"in vitro" des fractions protéiques du Soja**

Soutenue publiquement le 11 Juillet 1972 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président : M. C. ALAIS

Examineurs : MM. R. GAY
G. DEBRY

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE MARYLAND

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN AGRICULTURE

par

M. S.

Paul Louis Hing



Étude de la dénaturation et de la digestion enzymatique
"in vitro" des fractions protéiques du soja

Imprimé par la Direction de l'Édition, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025

Thèse de la
Université de
Maryland
à la
bibliothèque

ETUDE DE LA DENATURATION ET DE LA DIGESTION ENZYMA-
TIQUE " IN VITRO " DES FRACTIONS PROTEIQUES DU SOJA

-:-:-:-

	page
- I - <u>INTRODUCTION</u>	4
1.1. Importance alimentaire du soja	4
1.2. Nomenclature des constituants de la protéine de soja	4
1.3. Propriétés des protéines de soja	11
1.4. Orientation et but du travail	13
-II - <u>MATERIELS & METHODES</u>	15
2.1.1. - Préparation des fractions des protéines de soja	15
2.1.2. Fraction insoluble à froid (PF) de la protéine de soja	15
2.1.3. Fraction insoluble à pH 4,5	17
2.1.4. Extrait aqueux (Fraction EA)	19
2.1.5. Dénaturation par chauffage	20
2.1.6. Dénaturation par l'éthanol	20
2.1.7. Dénaturation par guanidine et le mercaptoethanol	20
2.2. - Méthodes de dosage	21
2.3. - Méthodes Electrophorétiques	23
2.4. - Digestion enzymatique	26
-III - <u>RESULTATS</u>	27
3.1. - Effets de la dénaturation sur les pro- priétés des fractions protéiques du soja	27
3.1.1. Modifications apparentes des solutions protéiques	27

3.1.2. Solubilité des protéines dénaturées	28
3.1.3. Diagrammes d'électrophorèse des fractions protéiques	29
3.2. - Digestion enzymatique des protéines non dénaturées	38
3.3. - Influence de la dénaturation thermique sur la digestibilité	39
3.3.1. Action de la pepsine	39
3.3.2. Action de la trypsine	41
3.4. - Influence de la dénaturation par l'éthanol sur la digestibilité	43
3.4.1. Action de la pepsine	43
3.4.2. Action de la trypsine	46
3.5. - Influence du traitement par la guanidine et le mercaptoethanol	49
3.5.1. Action de la pepsine	49
3.5.2. Action de la trypsine	49
- IV - <u>DISCUSSION</u>	53
4.1. - Protéines de méthodologie	53
4.2. - Dénaturation par le chauffage	54
4.3. - Dénaturation par l'éthanol et la guanidine	57
4.4. - Digestion des protéines natures et dénaturées	59
- V - <u>RESUME</u>	61
- VI - <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	64

ABBREVIATIONS

N.P.N. : azote non protéique
T.C.A. : acide trichloracétique
P.F. : fraction précipitée à froid
E.A. : fraction extraite par l'eau
F.pH 4,5: fraction insoluble à pH 4,5

ENZYMES

Pepsine E.C. 3.4.4.1.
Trypsine E.C. 3.4.4.4.
Aspergillopeptidase E.C. 3.4.4.17

AVANT - PROPOS

Avant l'exposé de ce travail, je suis heureux d'exprimer ici toute ma reconnaissance et mes plus vifs remerciements à M. le Professeur ALAIS pour l'aide qu'il m'a apportée dans la conduite de mes recherches. Sa compétence dans le domaine des protéines et des enzymes, ses conseils, son dévouement, l'esprit d'équipe des chercheurs et techniciens de son laboratoire ont été pour moi de précieux soutiens.

Je remercie M. le Professeur GAY et M. le Professeur DEBRY d'avoir bien voulu faire partie du Jury. Je souhaite que mes résultats intéressent le Professeur DEBRY et d'autres nutritionnistes qui étudient la digestion in vivo du soja.

De loin, j'exprime aussi ma gratitude aux éminents spécialistes américains, qui m'ont donné des précieux conseils lors de mon voyage aux U.S.A., en particulier le Dr W.J. WOLF, et Dr O.L.C. WANG, Chefs du service des recherches sur les farines du "Northern Utilization Research Division" de Peoria (Ill.), le Dr N. CATSIMPOOLAS, Chef du Laboratoire de chimie des protéines au "Central Soya Research Center " à CHICAGO (Ill.) et le Dr H.T. CHEN de l'Université de Cornell (N.Y.).

Enfin, je n'oublie pas l'équipe de Recherche de Biochimie de M. Ch. ALAIS et le Personnel de notre laboratoire et celui de l'Ecole de Laiterie de NANCY où je reçus de l'aide au début de ce travail. Ils ont tous été très compréhensifs pour l'étranger que je suis et qui ne possède la langue française qu'imparfaitement.

I- I N T R O D U C T I O N

1.1.- IMPORTANCE ALIMENTAIRE DU SOJA

Le soja (*Glycine max*) est une légumineuse herbacée annuelle qui est spontanée en Chine et au Japon. Les graines, qui ressemblent à de petits haricots, ont un grand intérêt alimentaire, car elles sont riches en protides (30 % en moyenne) et pauvres en amidon ; elles contiennent en outre environ 20 % de lipides et les cendres renferment 30 % de phosphates.

La cellule du cotylédon de soja renferme de nombreuses inclusions, comme le montre la figure 1. Les plus petites, d'un diamètre de 0,2 - 0,3 microns, sont les sphérosomes (S) lipidiques. Les plus grosses, d'un diamètre de 2 à 20 microns, sont des inclusions protidiques (PB) ; 60 à 70 % des protéines de la graine se trouvent localisées dans cette structure, entourée d'une membrane phospholipidique qui n'est pas dissoute par l'hexane ni l'éther éthylique et qui représente 4% de la protéine brute (4, 5, 6, 7). Les phospholipides peuvent être éliminés par traitement à l'alcool.

Le soja a une longue histoire, comme aliment, dans les pays d'extrême-orient. Un livre de médecine vieux de 5 000 ans le cite ; sa culture a été ordonnée par un décret impérial daté de 2800 ans avant J. - C. Depuis des siècles, les peuples orientaux ont développé des aliments pour l'homme, très variés, à partir du soja, selon des procédés qui comprennent la cuisson, le moulage, l'extraction et la germination (1), (2). Parmi les produits typiques, et en dehors de la farine utilisée pour les soupes et les galettes, on peut citer :

-Le Tofu, ou fromage de soja, obtenu par coagulation avec le sulfate de magnésium ; ce caillé est fait surtout en Chine. (100).

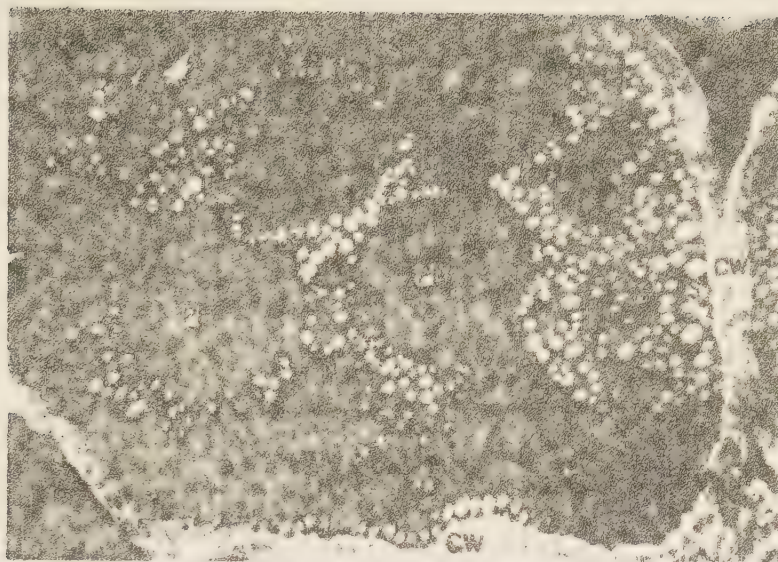


Fig. 1. - Micrographie électronique de la section du cotyledon de graine de soja mure (36) (voir texte).

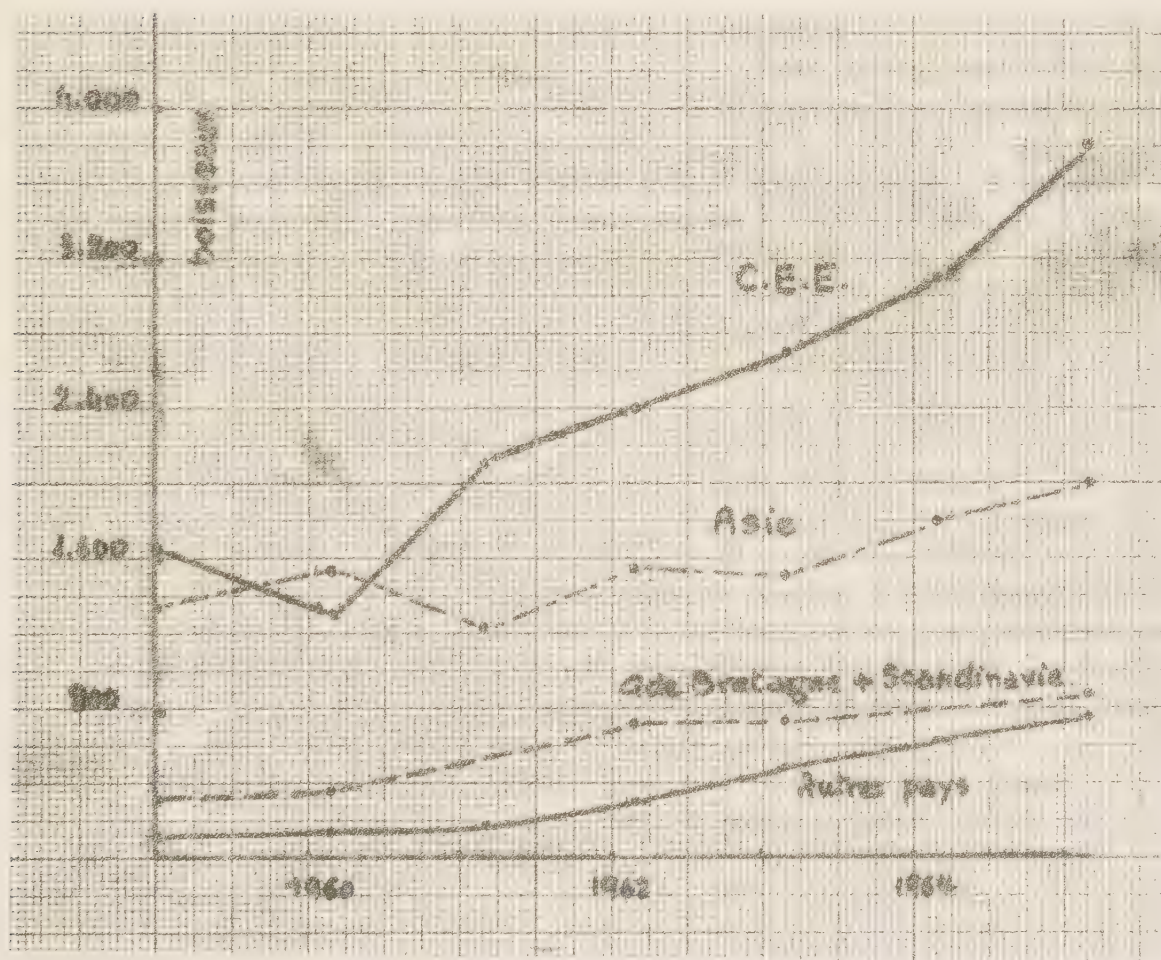


Fig. 2. - Exportations annuelles de farine de soja des U.S.A.

- Le lait de soja, obtenu par broyage des graines avec du sucre et des sels de potasse, (101) (102).
- Le Shoyer, ou sauce de soja (Chine et Japon)
- Le Miso, ou beurre de soja, obtenu par fermentation de la farine (Japon et Chine)
- Le Tempeh, pâte fermentée de l'Indonésie

Dans la deuxième moitié du 19ème siècle la culture du soja s'est développée sur de grandes surfaces en Europe puis en Amérique. Le tableau 1 (3) montre que la production asiatique en 1964 ne représente plus que 36 % de la production mondiale de soja, contre 58 % pour les Etats-Unis. Le diagramme de la figure 2 montre que les U.S.A. sont un important fournisseur de soja pour l'Europe, où l'utilisation du soja se développe de plus en plus mais où la production, hormis l'U.R.S.S., est encore très limitée

Aux U.S.A. la tendance actuelle est d'utiliser une qualité spéciale de farine dégraissée de soja et les protéines concentrées retirées de cette farine. Mais cinq produits commerciaux se trouvent sur le marché et il se peut que d'autres fractions et recombinaisons soient créées dans l'avenir (9) (10) (11) (12) (13).

Ces cinq produits sont :

- a) Farine complète de soja (grains de soja décortiqués et broyés)
- b) Farine dégraissée (délipidée ou déshuilée)
- c) Protéine concentrée (après élimination des hydrates de carbone visqueux)
- d) Protéine isolée (après élimination des hydrates de carbone et des fibres)
- e) Mélange lipide-protéine additionné d'un enzyme modifiant la protéine de soja.

Leur composition moyenne est reportée dans le tableau 2.

T A B L E A U I

Production du soja dans le monde en 1964 (*)

Région	Pays	milliers de tonnes	Proportion(%)
Europe	U.R.S.S.	238	0,72
	autres pays	15	0,05
Amérique du Nord	Etats-Unis	19 048	57,72
	Canada	190	0,58
	autres pays	22	0,067
Amérique du Sud	Argentine	450	1,36
Asie	Chine continent.	10 770	32,64
	autres pays	1 140	3,45
Afrique	Nigéria	20	0,06
	autres pays	35	0,11
TOTAL MONDIAL		33 000	100

* Document F.A.O. (11) ; soja en grains.

Les pays suivants sont petits producteurs (moins 1 000 tonnes)
Mexique, Brésil, Birmanie, Formose, Inde, Indonésie, Japon, Corée,
Thaïlande, Sénégal.

T A B L E A U II

Composition des produits provenant du soja

	Protéine %	Huile %	Applications
Grains de soja	33 %	18 %	lait, alimentation traditionnelle caillé fermenté, pâtes (12) (13) (14)
Farine complète de soja	42 %	20 %	lait, supplément sauce de soja
Farine dégraissée	50 %	1 %	lait, supplément aliments "texturés" (15)
Protéine concentrée	60 70%	1 %	comme ci-dessus et produits carnés, additifs fonctionnels
Protéine isolée	95 %	1 %	fibres, colloïde, aliments texturés additifs fonctionnels (16) aliments pour enfants
Protéine -Lipide combinaisons et enzyme modifié protéine de soja	variée	variée	aliments texturés supplément viande - produits pour enfants additifs fonctionnels

C'est sur le plan de la fourniture des protéines que l'intérêt du soja est le plus grand.

La déficience protéines reste le plus important problème alimentaire dans la plupart des pays en voie de développement, (14). Les produits animaux sont les meilleures sources de protéines, mais ils sont plus chers que ceux d'origine végétale. C'est pourquoi des efforts sont fait actuellement pour rechercher de nouvelles ressources de protéines, principalement d'origine végétale. Le soja représente une vaste réserve de protéines, bien que jusqu'ici on en ait utilisé très peu pour alimentation humaine. Par suite de son faible coût et de sa haute valeur nutritive, surtout due aux protéines contenant les acides aminés essentiels, il est généralement reconnu que le soja est un excellent aliment et l'une des meilleures et des moins chères sources d'énergie alimentaire en calories par unité de coût de production (15). La composition de la protéine totale de la farine de soja est donnée dans le tableau 3, avec celle de la principale fraction (11 S). Cette protéine est riche en lysine et en arginine ; par contre elle contient peu de méthionine et de tryptophane.

L'emploi du soja dans l'alimentation humaine se heurte à certaines difficultés dont les principales sont :

a) Les grains et la farine ont un goût et une odeur peu agréable (16) (17) (18) (19)

b) On observe une tendance à la rancidité lors du stockage. (20)

c) Il peut se produire une fermentation dans l'intestin lors d'une forte consommation (21)

Des études enzymologiques et technologiques approfondies sous les deux aspects de la nature et du traitement des protéines de soja sont très importantes pour permettre dans les années à venir de surmonter ces obstacles et de contribuer ainsi à l'amélioration de l'alimentation humaine. (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29).

T A B L E A U I I I

Composition en acides aminés de la protéine de soja (*) (37)

Acides aminés	protéine totale	protéine 11 S	protéine 7 S
lysine	6,0	4,3	7,01
histidine	2,4	2,0	1,67
arginine	7,8	7,3	8,82
acide aspartique	12,6	9,8	14,13
thréonine	3,6	2,9	2,81
sérine	5,7	3,8	6,77
acide glutamique	22,4	21,7	20,50
proline	5,4	5,8	4,33
glycine	4,1	4,0	2,85
alanine	3,9	4,0	3,70
cystine	1,2	1,4	0,26
valine	4,7	4,5	5,08
méthionine	1,2	1,1	0,25
isoleucine	4,8	4,2	6,40
leucine	7,9	6,9	10,25
tyrosine	3,8	3,2	3,61
phénylalanine	5,5	4,8	7,39

* en g. pour 16 g N (100 g protéine) ; (60) ; méthode de Stein et Moore.

1.2. - NOMENCLATURE DES CONSTITUANTS DE LA PROTEINE DE SOJA.

Le problème est encore loin d'être résolu car les constituants protéiques de la farine de soja sont nombreux et encore imparfaitement connus pour la plupart. Certains termes employés autrefois ne peuvent pas être retenus, comme : albumine, caséine, phaséoline, légumeline ou protéose, car ils sont ou trop généraux ou utilisés antérieurement pour des protéines ayant une autre origine. Par contre le terme "glycinine" (du nom latin du soja), introduit par Osborne et Campbell (30) est à conserver, en améliorant sa définition, pour désigner la principale globuline du soja. D'autres fractions pourraient être désignées avec le préfixe con- (avec) et un numéro : conglycinine -I, etc., comme on le fait pour des fractions protéiques provenant d'autres graines (concanavaline, conarachine...), selon les propositions de Wolf (31), président du Comité de Nomenclature des protéines du soja, aux U.S.A.

Le fractionnement par ultracentrifugation a permis à Naismith (32) de distinguer 4 fractions, d'après leur coefficient de sédimentation ; ce sont les fractions 2S, 7S, 11S et 15S. Plus tard la filtration sur gel a rélévé un plus grand nombre de fractions (Hasegawa et al, (33), dont plusieurs se trouvent dans la région 7 S. En gros, un tiers de la protéine de soja se retrouve dans la fraction 11 S, qui est la plus homogène (glycinine). Un deuxième tiers dans la fraction 7 S, qui est hétérogène ; elle renferme une globuline (conglycinine) et des petits constituants : hémagglutinine, lipoxydase et bêta-amylase. Le reste correspond aux fractions légères et lourdes, 2 S et 15 S.

1.3. - PROPRIETES DES PROTEINES DE SOJA

La plupart des protéines de soja sont des globulines, insolubles dans l'eau au voisinage de leur point isoélectrique, mais solubles en présence de sels à faible concentration. On n'a pas trouvé de constituant soluble dans l'alcool, comme les prolamines des céréales (gliadine, hordénine, zéine,...).

C'est pourquoi la farine de soja n'a pas de valeur boulangère ; elle ne peut former une pâte comparable à celle que forme la farine de blé.

Des études de structure dans l'espace des globulines de type 11 S et 7 S ont montré que les protéines de soja, contiennent peu ou pas d'hélices ; on observe des structures antiparallèles croisées à côté de parties en désordre (34). Il est certain que les liaisons secondaires hydrophobes jouent un grand rôle dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle. La plupart des chaînes latérales non polaires seraient situées au centre des molécules où elles formeraient des régions hydrophobes ; les régions hydrophiles sont situées vers la surface externe. La tyrosine et le tryptophane sont inclus dans les zones hydrophobes (35).

Les globulines 7 S et 11 S contiennent deux liaisons disulfure par molécule ; il est probable que d'autres liaisons unissent les sous-unités qui paraissent être au nombre de neuf (36).

La destruction des structures secondaires et tertiaires favorise l'hydrolyse par les protéases (endopeptidases) ; en effet, la vitesse est très faible avec les protéines natives du soja.

La glycinine est la principale et la mieux étudiée des protéines de soja ; mais ce nom doit être réservé au constituant formant l'essentiel de la fraction 11 S. Elle a un poids moléculaire élevé, environ 350 000 à pH 7,6 et force ionique 0,5 ; mais lorsque les conditions physiques changent, des résultats différents sont trouvés. Cette molécule est certainement un agrégat de sous-unités, dont le nombre pourrait atteindre 12 (38) . La détermination des groupements N-terminaux confirme cette hypothèse ; on a trouvé 8 résidus de glycine, 2 de leucine et 2 de phénylalanine par molécule de 350 000. Les sous-unités peuvent se séparer au cours de l'électrophorèse en milieu dissociant ; trois fractions ayant la glycine en position N-terminale sont des protéines basiques ; elles migrent vers la cathode à pH 8,6 (39). Ces sous-unités

basiques isolées sédimentent dans la zone 2 S. La glycinine n'est probablement pas une glycoprotéine ; la fraction 11 S purifiée ne contient que 0,2 % de glucose.

Dans la fraction 7 S, à côté d'enzyme en faible proportion et d'une hémaglutine, se trouve une globuline 7 S ou conglycinine 7 S. Un poids moléculaire d'environ 180 000 (pour certains auteurs : 210 000) a été déterminé, à pH 7,6 et f.i.0,5 ; le point isoélectrique est 4,9 (40). Cette protéine se dimérise réversiblement lorsque la force ionique diminue (0,1) ; le dimère a un coefficient de sédimentation de 9 S ; il se forme même en présence d'un agent réducteur (41) (42). En position N-terminale on a trouvé 7 à 9 résidus d'acides aminés variés. Cette protéine contient 4,8 % de glucose (43) (44).

1.4. - ORIENTATION ET BUT DU TRAVAIL

Au début de notre travail au laboratoire de Biochimie appliquée, nous avons essayé de fractionner les protéines de soja à partir de grains et de farine traités à l'hexane, pour nous familiariser avec la complexité de ces protéines. Nous avons obtenu la fraction 11 S incomplètement pure. Au cours de notre voyage aux U.S.A. nous avons constaté que l'obtention de fractions très pures, avait été réalisée au "Laboratory of Protein Chemistry, Central Soya Research Center" (CHICAGO). Nous avons donc changé d'orientation et, sur les conseils d'un des savants les plus actifs et des plus connus dans le domaine du soja (Dr Catsimpoalas), nous avons entrepris l'étude de la digestion in vitro de différentes fractions de la protéine de soja par les protéases digestives. Ces fractions ne sont pas pures, mais elles ont une composition caractéristique et elles peuvent être obtenues industriellement. Nous les avons soumises à différents traitements préalables en vue d'atteindre une meilleure digestion ; mais un autre but de tels traitements pourrait être l'amélioration des qualités organoleptiques et de la valeur nutritive des protéines de soja, (38) (56) (78) (92) (104).

Nous avons choisi trois fractions importantes :

Fraction "PF", précipitée à froid (0-3°) qui est constituée essentiellement de glycinine 11 S (92 - 95 %) ; elle contient environ 5-8 % de globuline 7 S, mais pas de constituant 2 S et 15 S (45). Etant donné que l'obtention de 11 S pure est difficile et qu'il nous en faut des quantités assez élevées, nous employons la fraction PF comme substitut 11 S.

Fraction pH 4,5, Cette fraction n'est pas du tout homogène ; elle contient toutes les protéines insolubles en milieu acide, procédé utilisé dans l'industrie pour obtenir le "concentré de protéines". Mais elle ne contient pas les fractions solubles, notamment l'inhibiteur de trypsine.

Fraction "EA", c'est l'extrait aqueux de la farine de soja ; il contient les fractions d'ultracentrifugation 2 S et 7 S et l'inhibiteur de trypsine. De plus, c'est cette fraction qui est la plus colorée. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la composition de cette fraction (46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55,).

Nous avons, dans cette première partie de nos recherches, deux enzymes typiques du système digestif des mammifères :

- La pepsine , protéase du suc gastrique, agissant en milieu acide (pH. optimum voisin de 1,6)
- La trypsine, protéase du suc pancréatique, agissant en milieu neutre, (pH optimum 8,0) .

II - MATERIEL ET METHODES

2.1. - PREPARATION DES FRACTIONS DES PROTEINES DE SOJA

Toutes les fractions des protéines de soja que nous avons utilisées pour l'étude ont été préparées dans notre laboratoire avec de la farine dégraissée.

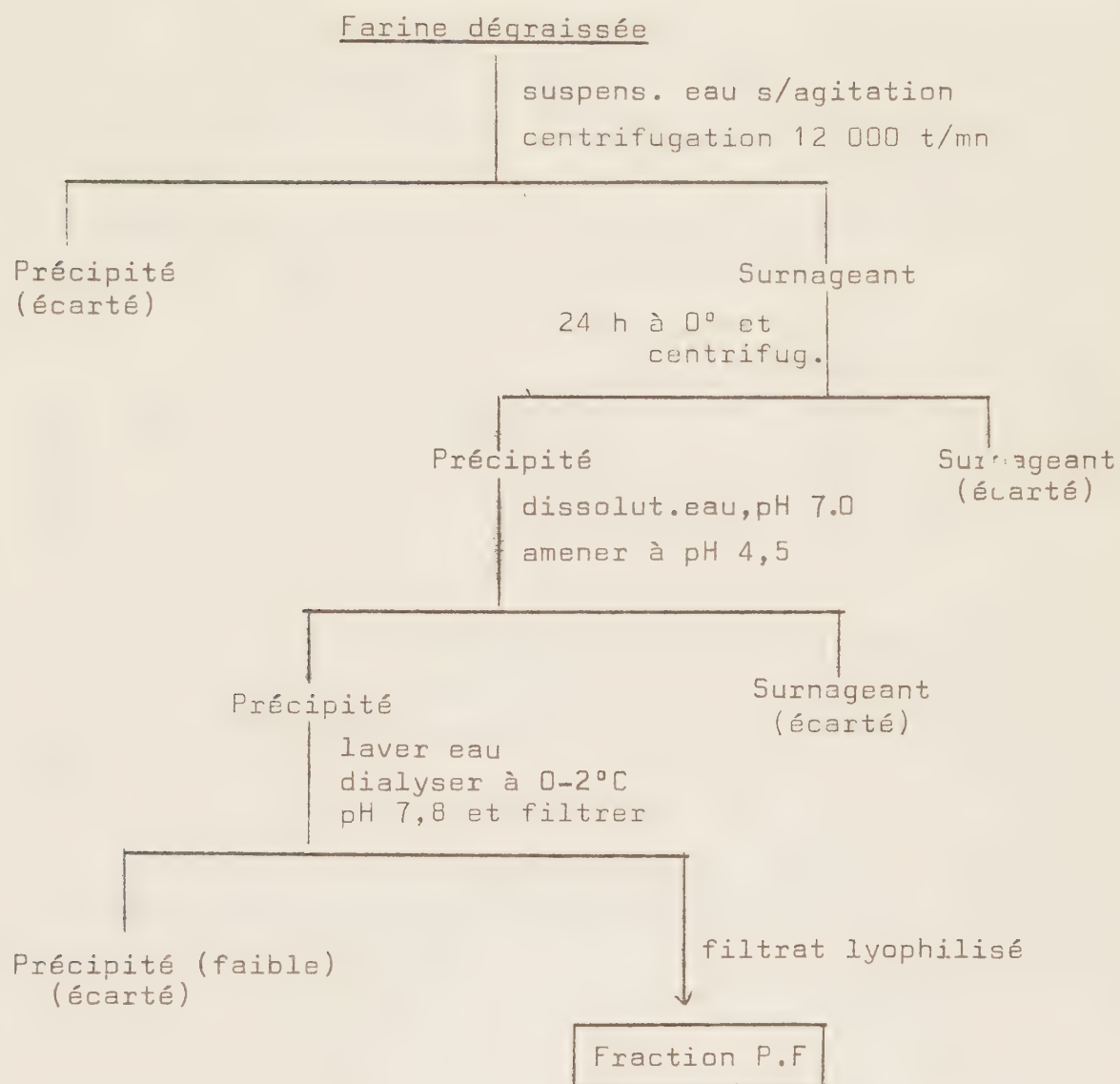
2.1.1- FARINE DEGRAISSEE DE SOJA

La farine dégraissée de soja qui nous a servi de matière première nous a été fournie par le "Laboratoire de Chimie des protéines", (Central soja Research Center, Chicago, U.S.A.). Elle provient des graines de soja "HAROSoy 63". Les grains sont éclatés, décortiqués et "floconnés". Les flocons sont dégraissés avec du pentane dans un extracteur "SOXHLET", pendant 4-5 heures.

2.1.2- FRACTION INSOLUBLE A FROID (PF) DE LA PROTEINE DE SOJA

Nous l'avons préparé, selon le schéma de la figure 3, d'après les indications de différents auteurs (57, 58, 59, 60, 61). Nous sommes partis de 1 kg de farine mis en suspension dans 5l d'eau distillée. A la fin des opérations, nous avons obtenu 30,8 g de fraction sèche pour 1 kg de farine dégraissée.

Figure 2 - Préparation de la fraction P F



2.1.3. - FRACTION INSOLUBLE à pH 4,5. (62,63,64)

Un kilogramme de farine dégraissée de soja est mis en suspension dans 10 litres d'eau distillée, plus de 5 ml de toluène, on ajoute 0,03 M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$; on met au bain-marie à 55°C sous vive agitation pendant une heure.

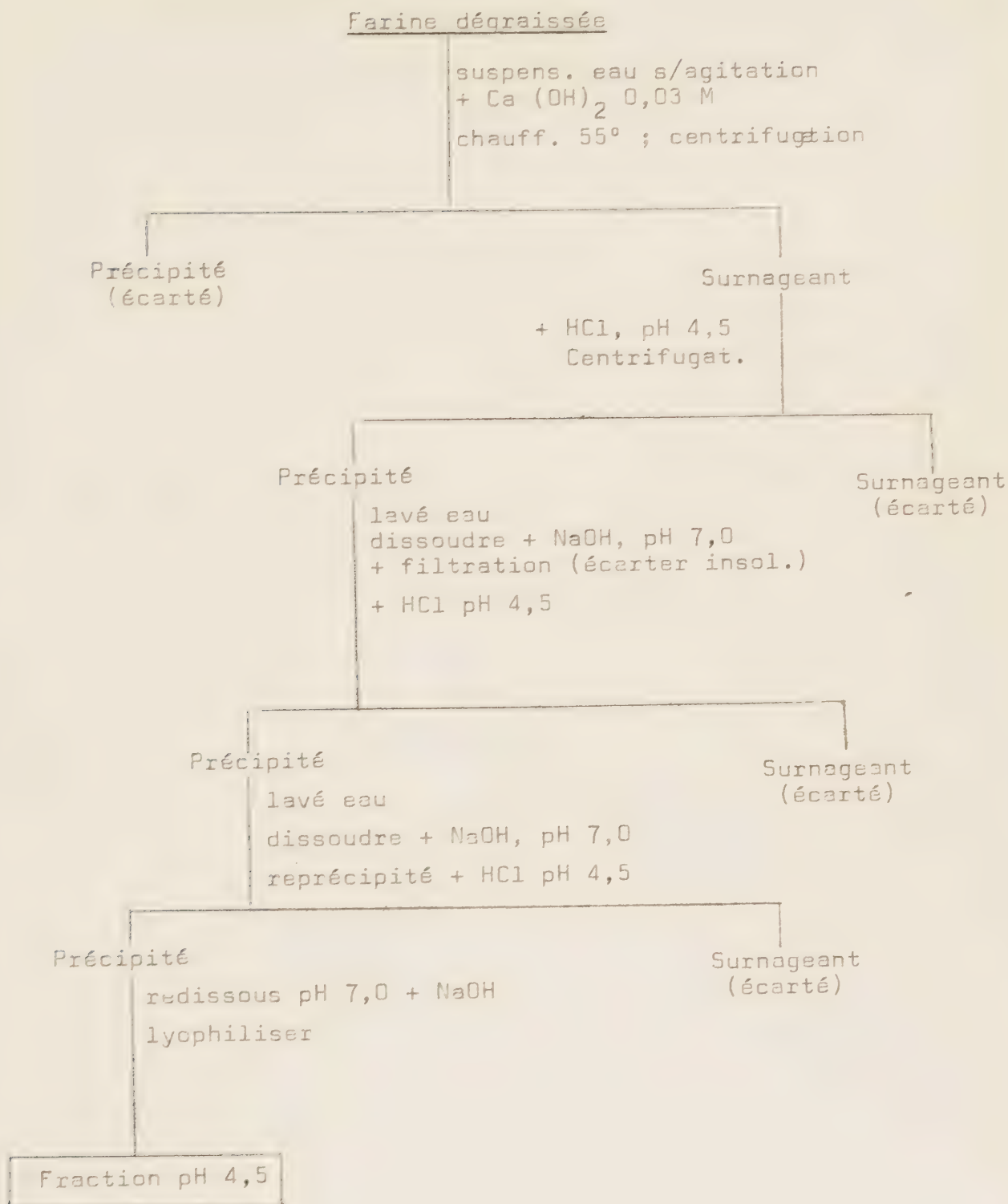
On centrifuge à 10.000 t/mn et recueille le surnageant ; on lui ajoute de l'acide chlorhydrique 1 M pour atteindre pH 4,5 ; on sépare le précipité par centrifugation à 10.000 t/mn. Le précipité est lavé par agitation dans 3 litres d'eau distillée, en ajustant le pH à 4,5, centrifugé ; ces opérations sont répétées deux fois de suite.

Le culot est mis en suspension dans 5 l d'eau avec 0,5 ml/l de toluène, au bain-marie à 25°C, et dissous par addition lente de NaOH 1 N, sans dépasser pH 7,0 ; la solution est passée sur Büchner, pour éliminer les particules insolubles.

On répète la précipitation et le lavage. Le travail est conduit de telle manière que l'on a en fin de journée un précipité de protéine essoré et conservé la nuit au réfrigérateur à 1°C.

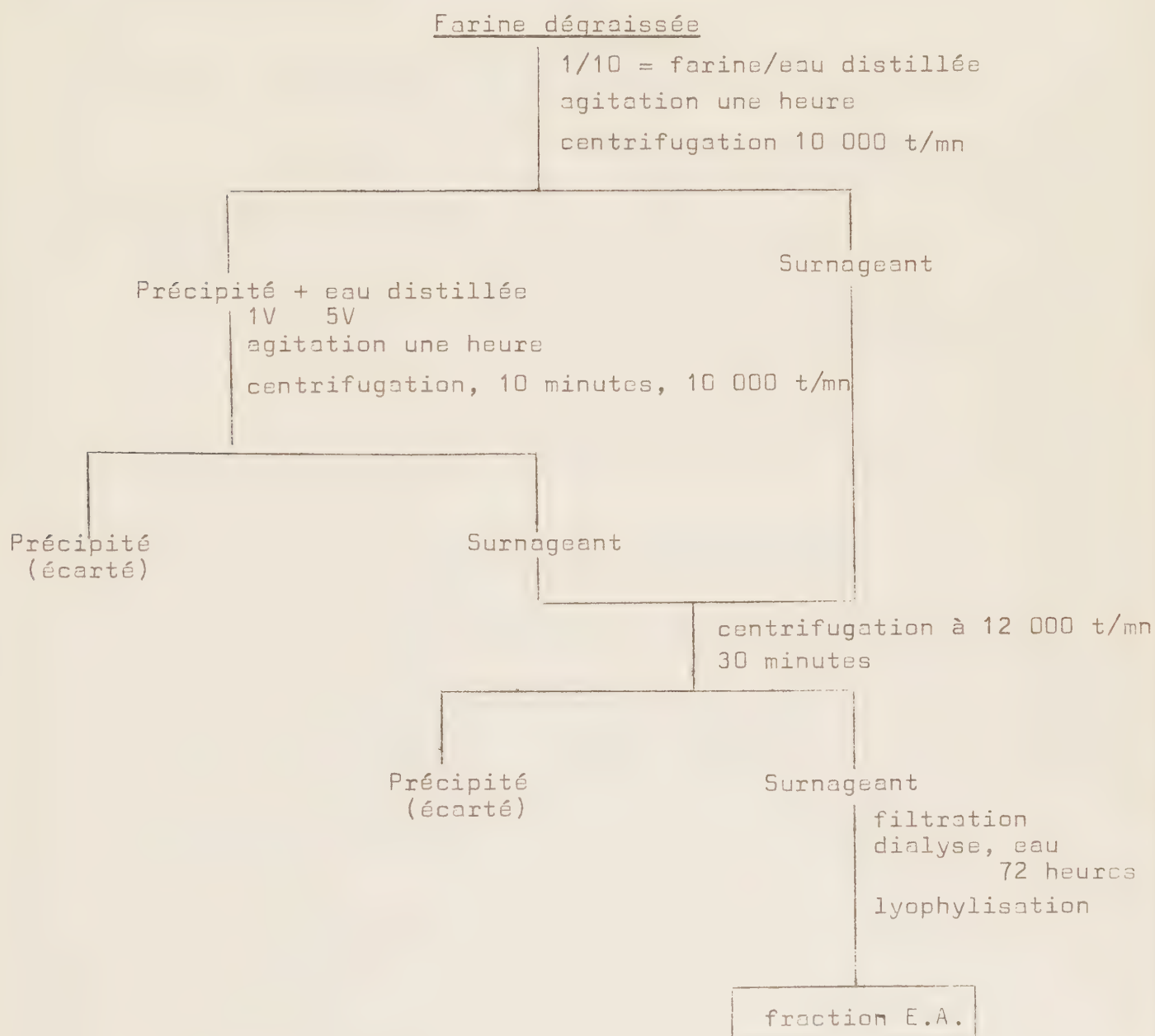
La dernière dissolution à pH 7 est séchée par lyophilisation. Nous avons obtenu 362,6 g de fraction sèche pour 1 kg de farine dégraissée.

Figure 4. - Préparation de la fraction pH 4,5



2.1.4. - EXTRAIT AQUEUX (FRACTION E.A.)

La figure 5 présente le schéma de la préparation. Nous sommes partis de 1 kg de farine dégraissée mis en suspension 1 litre d'eau ; nous avons obtenu 62,15 g de fraction sèche pour 1 kg de farine dégraissée.



2.1.5. - PROTEINE DE SOJA - DENATURATION PAR CHAUFFAGE

Les fractions protéiques sont dénaturées par chauffage sous agitation au bain-marie de glycérine, à 100°C, par fraction de 50 ml de 0,8 % de concentration dans un erlen qui est bouché au caoutchouc pour réduire l'évaporation. La durée de chauffage est de 10, 20, 30, 60 ou 120 minutes. A la fin du temps de chauffage désiré, l'erlen est transféré au bain-marie à 0°C, puis on lyophilise son contenu.

2.1.6. - DENATURATION PAR L'ETHANOL

A 1 g de fraction protéique on ajoute 10 ml de solution dénaturante ; on agite vivement pendant une heure et on conserve ensuite le mélange à 3°C pendant une semaine.

On fait avec chaque fraction une série de 10 essais : eau pure, éthanol 10 %, 20 %, 30 %, 60 %, éthanol absolu.

Finalement on évapore l'alcool au bain-marie à 50° et on lyophilise le résidu aqueux.

2.1.7. - GUANIDINE CONTENANT DU MERCAPTOETHANOL

La solution dénaturante contient du chlorure de guanidinium 6 M (573,2 g/l) et du 2-mercaptoethanol 0,2 M (15 g/l). On met 2 g de chaque fraction protéique dans 100 ml de solution, à température ambiante ; on agite pendant 1 heure puis on conserve 24 h à 1-3°C. Ensuite on élimine les réactifs par une longue dialyse (6 jours) et on lyophilise la solution.

2.2. - METHODES DE DOSAGE

2.2.1. - DETERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE TOTAL

Nous avons dosé l'azote par microanalyse Kjeldahl d'après la méthode de CLARK (65), avec quelques modifications ; le catalyseur (a) contenait du sulfate ferreux, à l'exclusion des sels de cuivre ou de mercure, comme le recommande Foullouze (66). La distillation de l'ammoniac a été conduite dans un appareil du Büchi ; l'ammoniac distillé est reçu dans une solution à 1 % d'acide borique (b) contenant un indicateur mixte (c) ; vert de bromocrésol + rouge de méthyle (67) ; la filtration est faite par l'acide sulfurique N/100, au moyen d'une burette automatique.

La prise d'essai doit contenir de 0,05 à 0,3 mg d'azote, soit 0,3 à 2 mg de protéine. Si l'acide titré est exactement N/100, le blanc est a, et la lecture de la burette est n ml, on calcule : $N \text{ mg} = (n - a) \times 0,14$

2.2.2. - DETERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE NON PROTEIQUE

Nous avons suivi les techniques décrites par Rowland (68) : pour l'azote non protéique du lait : précipitation avec l'acide trichloracétique à 12 % de concentration finale, dosage de l'azote dans le filtrat, comme ci-dessus.

2.2.3. - COMPOSITION DES REACTIFS

a) Catalyseur de digestion (Kjeldahl), broyer ensemble :

sélénium métal, en pou're.....	1 g
sulfate ferreux, cristallisé.....	5 g
sulfate de potassium, cristallisé.....	32 g

b) Solution pour la distillation de l'ammoniaque :

acide borique.....	10 g
éthanol absolu.....	200 ml
eau distillée.	750 ml

Amener à dissolution et ajouter :

- 10 ml indicateur mixte (c)

Si besoin est, ajouter un peu d'alcali (NaOH N/10) pour obtenir une coloration faiblement rougeâtre et compléter à 1000 ml.

c) Indicateur mixte :

Dissoudre dans 250 ml d'éthanol absolu ;

vert de bromocrésol..... 0,0825 g

rouge de méthyle..... 0,165 g

2.2.4. - MESURE DE L'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET : l'absorption des filtrats trichloracétiques a été mesurée au spectrophotomètre Beckman Acta-II à 280 m μ dans le liquide acide.

2.3. - METHODES ELECTROPHORETIQUES

Nous avons utilisé successivement trois techniques d'électrophorèse se reliant aux deux méthodes : électrophorèse de zone (sur acétate de cellulose), qui permet de réparer les protéines selon leur charge nette, et électrophorèse en gel, qui donne une meilleure résolution des fractions protéiques car il s'ajoute un effet de "tamisage moléculaire". Nous avons essayé deux gels : polyacrylamide et amidon, et c'est avec ce dernier que nous avons obtenu les meilleures séparations.

2.3.1. - ELECTROPHORESE SUR BANDES D'ACETATE DE CELLULOSE

Les bandes d'acétate de cellulose "oxoïd" de 2,5 cm x 18 cm doivent tremper une nuit dans le tampon d'électrophorèse pour en être imbibées. Puis on les tend sur l'appareil à électrophorèse Pleuger, leurs extrémités plongeant dans les bacs à électrode remplis du tampon.

Après le dépôt minutieux à la micropipette de l'échantillon, on applique une tension de 220 à 400 volts, chaque bande supportant une intensité de 1 à 1,5 milliampères. La durée de migration était de 2 à 3 heures. Nous utilisons la coloration à la nigrosine .

Pour l'électrophorèse sur acétate de cellulose, nous avons essayé plusieurs tampons :

- le tampon véronal de sodium 0,04 M, véronal 0,08 M de pH 8,6 avec et sans urée 4M et mércaptoethanol,

- le tampon TRIS-citrique 0,076 M pH 7,5 avec Urée 4M et Mercaptoethanol.

2.3.2. - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Le support de l'électrophorèse est un gel obtenu par polymérisation à l'abri de l'air et en présence de deux catalyseurs d'une solution d'acrylamide $H_2C = CH-CO-NH_2$ et de N, N', métylène bisacrylamide $H_2C = CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$. (69)

Le tampon qui nous a donné les meilleurs résultats, pour l'instant, est le TRIS-gly 0,046M pH 8,3 utilisé par N. MELACHOURIS (70) dans sa méthode d'électrophorèse en gel discontinu horizontal, que nous avons adapté à l'EC 470 "vertical électrophoresis apparatus".

La préparation du gel est simple : nous utilisons le "Cyanogum 41" de chez Serva, qui est un mélange d'acrylamide et de bisacrylamide. Nous en préparons une solution à 7 % ou 9 % dans du tampon TRIS-gly 0,39 M pH 8,9, à laquelle nous ajoutons 0,1 % du catalyseur TEMED (N,N,N',N' tétraméthyl étylène diamine) . Une fois filtrée, la solution est conservée jusqu'à un mois à température ambiante .

Au moment de l'emploi, on ajoute du persulfate d'ammonium 0,1 % qui avec le catalyseur TEMED provoque la formation de radicaux libres à partir des monomères d'acrylamide et de bisacrylamide, d'où l'initiation de la polymérisation. Le gel coulé horizontalement dans l'appareil, en évitant toute bulle d'air, prend en 30 minutes, formant une plaque transparente de 12 cm x 8 cm. Quatre griffes placées dans le gel avant sa polymérisation, permettent une fois retirées, le dépôt de quatre échantillons dans leurs empreintes au sommet de la plaque de gel mise alors à la verticale. Les échantillons dissous à 10 ou 20 % dans le gel dilué sont alourdis au saccharose pour assurer une bonne pénétration.

Nous appliquons une tension de 200 à 300 volts, l'intensité étant environ de 60 mA et la durée de migration variant de 1 heure 1/2 à 3 heures suivant les expériences. A ce pH basique, les protéines descendent vers l'anode placée au bas de la plaque .

L'appareil est conçu de telle sorte que durant l'électrophorèse la plaque de polycrylamide est continuellement refroidie sur les deux faces par un courant d'eau ; toute distorsion par échauffement est ainsi évitée.

La migration terminée, on précipite les protéines par de l'acide trichloracétique 15 %, et on les colore au noir amido ou au bleu de comassie.

La conservation de la plaque de polyacrylamide décolorée est possible sur plaque de verre, entre deux feuilles de cellophane ou de Saran, mais les gels tendent à se fendre, à la longue, en se desséchant.

2.3.3. - ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON

Nous avons utilisé la méthode de Wake et Baldwin pour les caséines (71) (103).

On chauffe sous agitation, 55 g d'amidon hydrolysé "Connaught" dans 300 ml de tampon TRIS-citrique 0,76 M pH 8,6 contenant de l'urée 7 M et 1 ml de mercaptoéthanol. On observe un fort accroissement de la viscosité, qui ensuite diminue brusquement. Dès que la viscosité commence à baisser, on arrête le chauffage, et on dégaze sous vide. Puis, aussitôt on coule la suspension d'amidon sur une plaque horizontale entourée d'un cadre et couverte d'une autre plaque. On laisse une nuit à température ambiante, en atmosphère saturée d'eau.

Pour déposer l'échantillon nous n'utilisons pas la technique du réservoir. On glisse un papier d'Arche de 6 mm x 1 mm imprégné d'échantillon dans une fente verticale à 5 mm du bord de la plaque. Suivant la largeur de la plaque utilisée, 3 à 5 échantillons peuvent être étudiés simultanément. La liaison avec les bacs à électrode est faite par une bande de papier Whatman N° 1. Les bacs contiennent le tampon acide borique 0,3 M pH 8,6. Les protéines en milieu basique migrent vers l'anode. La plaque est recouverte de parafilm pour éviter l'évaporation.

L'électrophorèse est conduite à 4°C pendant 16 heures, à la tension de 175 volts, l'intensité étant 30 milliampères.

La migration terminée, on découpe en épaisseur la plaque de gel (à l'aide d'un fil de nylon) en trois fines lamelles que l'on colore au noir amido.

Après élimination du colorant en excès et addition de glycérine, le gel d'amidon est étendu sur une plaque de verre. Au bout de quelques jours, on constate un rétrécissement ; le gel devenu souple et élastique peut être conservé plusieurs années sans précautions.

2.4. - DIGESTION ENZYMATIQUE

Les fractions protéiques natures et dénaturées sont mises dans l'eau distillée, après agitation pour obtenir une solution homogène, la concentration finale est 0,8 %. On amène la solution au pH optimum de l'enzyme pH 1,6 pour la pepsine pH 8,0 pour la trypsine, avec HCl ou NaOH. Les tubes contenant les solutions sont fermés avec un bouchon et mis au bain-marie à 37°C ; après 20 mn, on ajoute l'enzyme. Le rapport enzyme/Substrat est 1/1 000 pour la pepsine et 2/ 1 000 pour la trypsine.

Nous avons employé la pepsine de la muqueuse gastrique du porc, deux fois cristallisée (Worthington), conservée à - 20°C; l'enzyme est dissoute dans NaCl 0,5 M. La trypsine cristallisée provient du pancréas de boeuf (Serva) ; elle est dissoute dans HCl N/100.

Des prélèvements sont faits à 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures et 8 heures. La protéolysine est arrêtée par addition d'un égal volume de TCA 24 % ; l'azote est dosé dans le filtrat.

Les changements de pH sont inférieurs à 0,2, mais ceci n'entraîne pas une modification de l'activité de l'enzyme.

III- R E S U L T A T S

3.1. - EFFETS DE LA DENATURATION SUR LES PROPRIETES DES FRACTIONS PROTEIQUES DU SOJA

Avant d'étudier la digestion enzymatique des fractions protéiques de la farine de soja, nous avons observé les effets des traitements dénaturants sur l'aspect des solutions. Nous avons ensuite fait une expérimentation sur la solubilité de ces fractions dans le réactif déprotéinisant, l'acide trichloracétique (TCA, 12 %), avant et après dénaturation, ce qui peut apporter des indications intéressantes sur le "degré" de dénaturation. En outre nous avons fait des examens électrophorétiques afin de connaître la constitution des fractions et d'apprécier les modifications subies au cours de la dénaturation.

3.1.1 - MODIFICATIONS APPARENTES : DES SOLUTIONS PROTEIQUES

Toutes les fractions sont complètement solubles dans l'eau, à la concentration de 0,8% (le pH de la fraction insoluble à 4,5 étant ramené à 7,0).

Le chauffage à 100° provoque une insolubilisation et un brunissement progressifs dans toutes les solutions ; après 10 minutes de chauffage l'effet est à peine visible, après 30 minutes, les modifications sont appréciables, après 2 heures ; il s'est formé un précipité dans tous les tubes et une teinte brune. C'est la fraction E.A. qui est la plus modifiée.

Dans l'éthanol à 10 %, les fractions sont presque entièrement solubles ; lorsque la concentration augmente, il y a de plus en plus de substance insoluble, soit sous forme de

précipité, soit sous forme de flocons légers se rassemblant vers le haut, comme le font les phospholipides en milieu aqueux (5). Cette dernière phase est faible dans les fractions E.A. et P.F; elle est abondante dans la fraction pH 4,5. L'effet de l'éthanol sur la couleur est faible.

Après traitement par la guanidine, il se forme un petit précipité dans les 3 solutions, qui s'aparifient.

3.1.2. - SOLUBILITE DES PROTEINES DENATUREES, DANS L'ACIDE TRYCHLORACETIQUE

Les fractions protéiques ont une certaine solubilité dans le réactif déprotéinisant. Pour des solutions à 0,8 %, on trouve que la proportion de l'azote qui est soluble à 12 % de T₁CA est de :

Fraction E.A.	= 15 %
Fraction P.F.	= 7,8 %
Fraction P.H. 4;5	= 3,11 %

Ces valeurs sont désignées par "NPN - 0" (azote non protéique avant digestion).

Les traitements dénaturants modifient cette solubilité mais il est possible que l'augmentation de l'azote soluble corresponde aussi à une dégradation du moins partiellement.

La figure 6 montre l'évolution de NPN - O au cours du chauffage à 100°C. Avec l'extrait aqueux il y a une augmentation de 1,7 % environ dès le début du chauffage, ensuite le NPN - O varie peu. Avec la fraction P.F. l'augmentation est plus grande ; plus de 4 % de l'azote total sont libérés en 20 minutes à 100° C ; cette fraction est la plus sensible à la dénaturation thermique. La fraction insoluble à pH 4,5 voit sa solubilité augmenter légèrement, comme la fraction E.A., mais plus progressivement.

Le traitement par l'éthanol accroît sensiblement la solubilité des fractions à faible concentration du réactif. Ici, c'est la fraction E.A. qui est la plus sensible ; avec 10 % d'éthanol, la proportion de NPN a plus que doublé (fig.7) ; au-delà de 30 %, la solubilité revient vers la valeur initiale. La fraction PF est un peu moins sensible à ce traitement (augmentation du NPN - O de 8 à 14 %) et la fraction pH 4,5 semble être très peu modifiée.

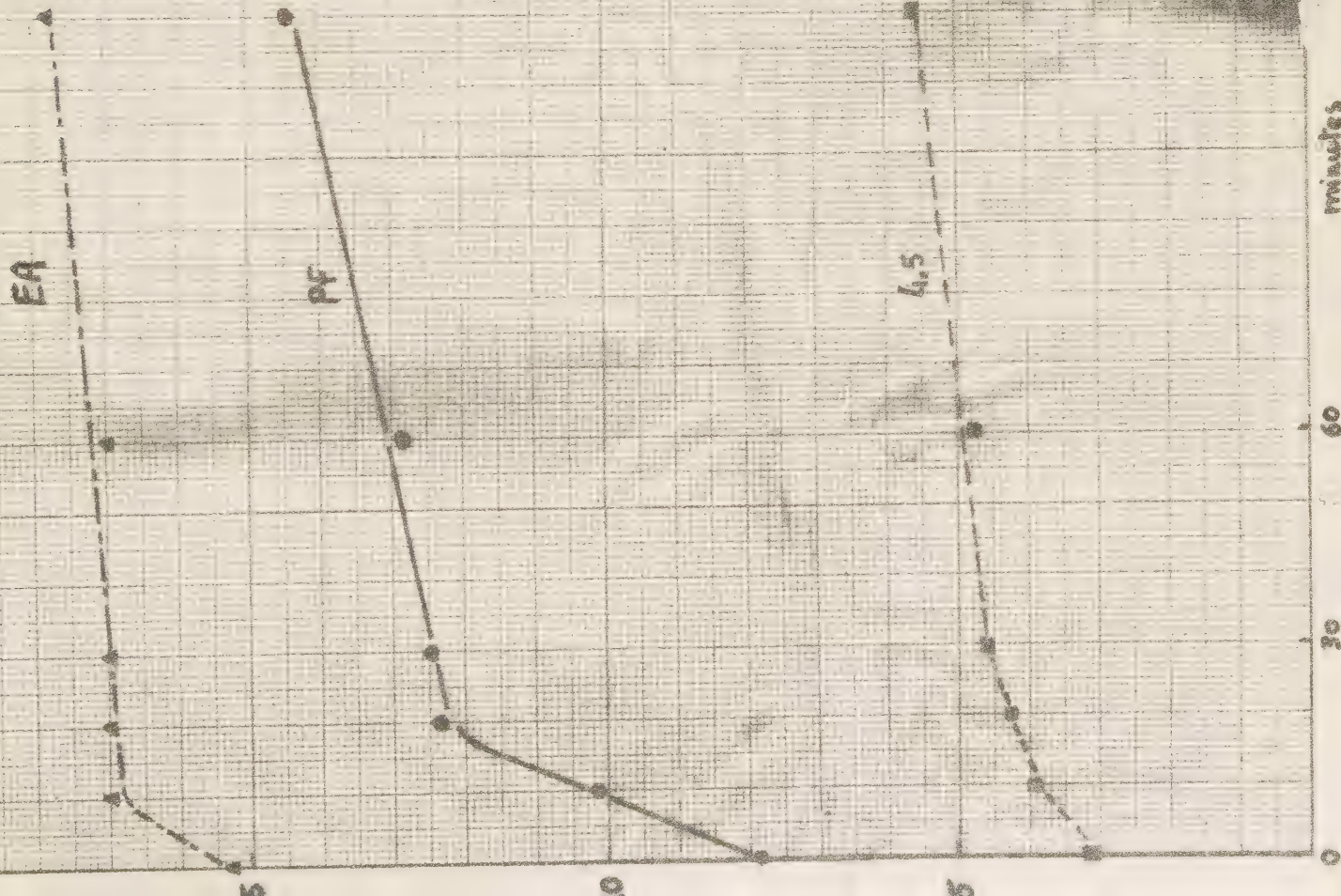
L'effet de la guanidine (une seule concentration : 6 M) se traduit par un faible accroissement de l'azote soluble. Après 24 heures de traitement, suivi de dialyse, nous avons obtenu les augmentations de NPN suivantes :

- Fraction E.A. : 1,0 % de N tot
- Fraction P.F. : 3,4 " " "
- Fraction pH 4,5: 1,0 " " "

3.1.3. - DIAGRAMME D'ELECTROPHORESE DES FRACTIONS PROTEIQUES

3.1.3.1. - Avant dénaturation

L'électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose nous a donné rapidement des résultats, mais avec une résolution médiocre. La fraction E.A., par exemple, ne donne que 5 bandes



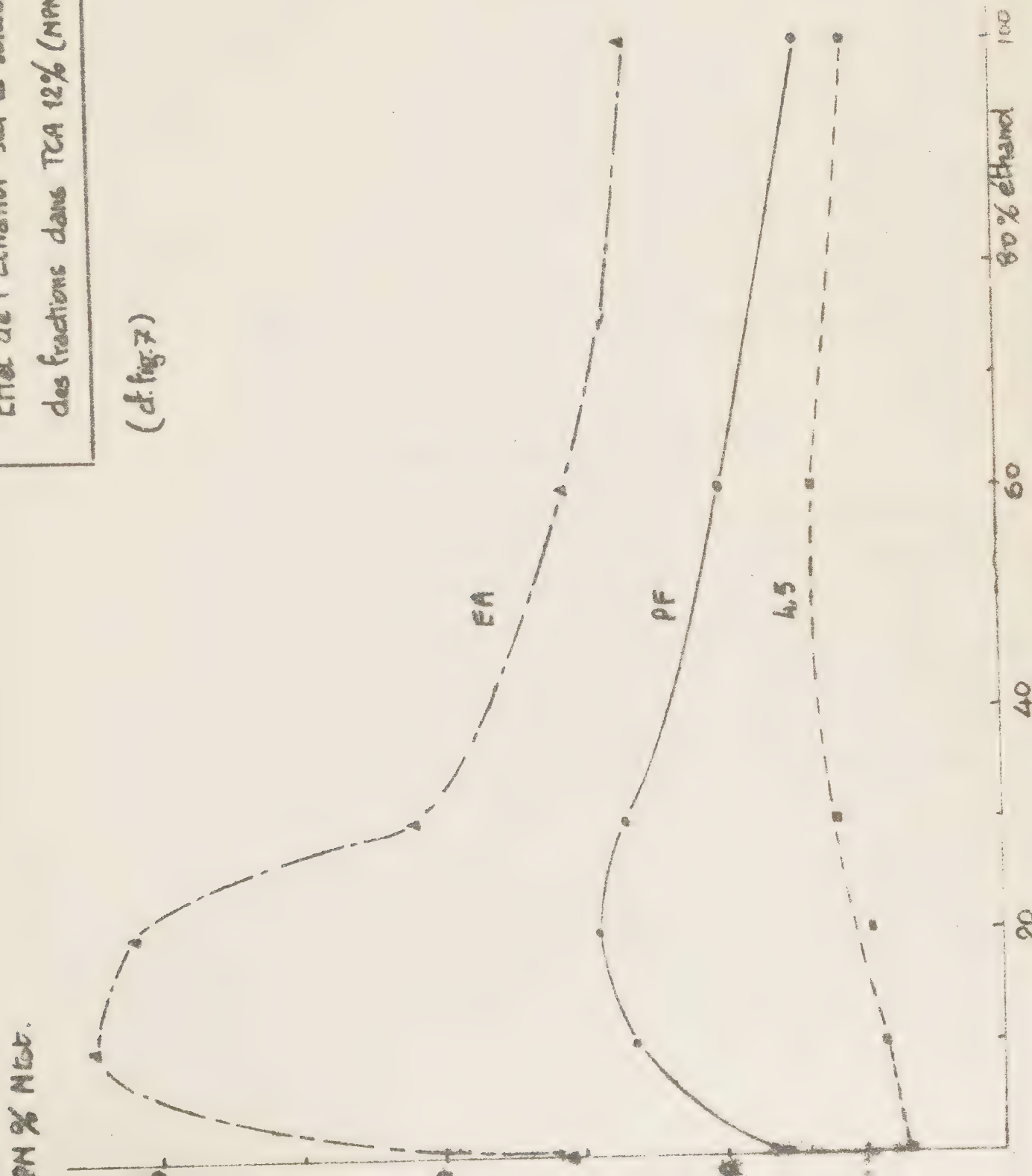
- △ --- EA : extrait aqueux (E.A.)
- --- PF : fraction insoluble à froid (P.F.)
- --- 4.5 : fraction insoluble à pH 4.5

Effet du chauffage à 100°
sur la solubilité dans l'acide
trichloracétique 12% (NPN-O)

Fig. 6

Effet de l'Ethanol sur la solubilité
des fractions dans TCA 12% (MNH-O)

(cf. fig. 7)



nettes sur ce support (tampons pH 8,6, 30 volts/cm) alors qu'en gel on en dénombre une douzaine.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide nous a donné de meilleurs résultats, mais cependant c'est l'électrophorèse en gel d'amidon, à pH 8,6, avec un tampon contenant de l'urée concentrée (7 M) et du merceptoéthanol qui a donné la résolution la plus fine. Dans ce milieu dissociant et réducteur, les sous-unités des protéines 11 S et 7 S sont séparées. La figure 8 montre, migrant vers l'anode, les 3 sous-unités basiques de la protéine 11 S, dans la fraction PF; du côté de la cathode on dénombre, comme prévu, 8 à 9 bandes d'intensité variable après coloration. La fraction pH 4,5, qui contient principalement 11 S et 7 S, donne un diagramme voisin de celui de la fraction PF. La fraction E.A., qui renferme les protéines solubles, est très différente des deux précédentes; on observe aucune bande du côté de la cathode et les bandes correspondant aux protéines chargées négativement n'occupent pas les mêmes positions sauf une.

3.1.3.2. - Après dénaturation thermique

Le traitement thermique modifie tous les diagrammes d'électrophorèse. Déjà après 10 minutes de chauffage; les deux bandes les plus rapides disparaissent dans la fraction E.A.; par contre les deux bandes principales persistent jusqu'à 60 minutes; après 2 heures de chauffage les bandes ne sont plus nettement visibles; le diagramme est confus. On sait que l'inhibiteur de trypsine se trouve dans cette fraction et qu'il est rapidement détruit à cette température (46); il s'agit probablement d'une des bandes rapides.

Dans la fraction P.F. les modifications sont moins grandes (fig.10); jusqu'à 30 minutes on reconnaît les principales bandes; au-delà, les sous-unités basiques tendent à disparaître et la zone des deux bandes principales du côté des constituants acides, devient confuse.



Figure 8 : Diagramme d'électrophorèse (voir texte)

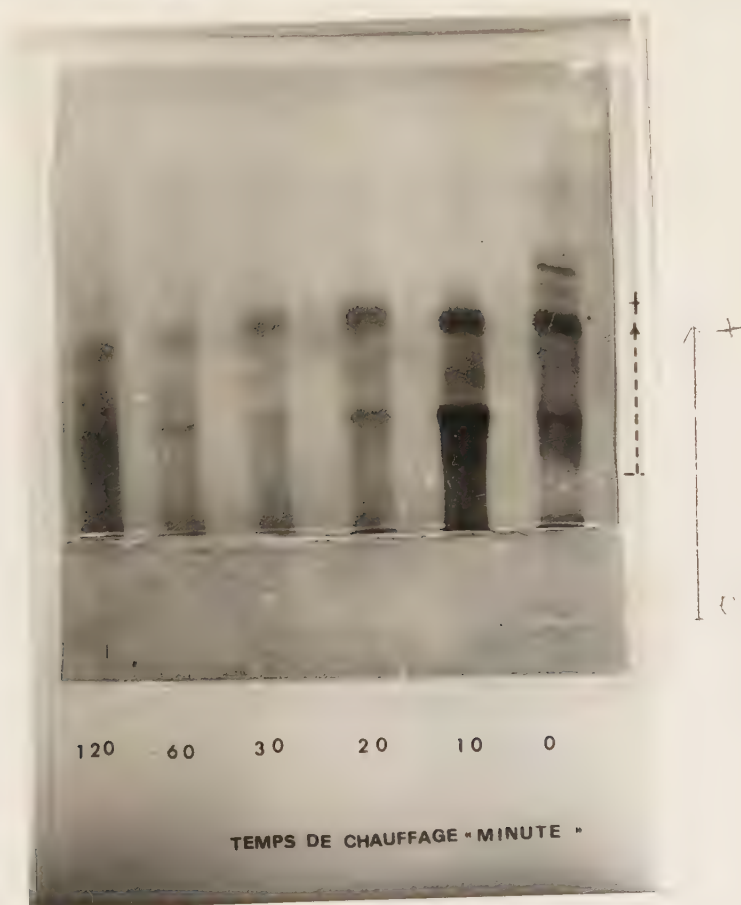


Figure 9 : Diagramme d'électrophorèse (voir texte)

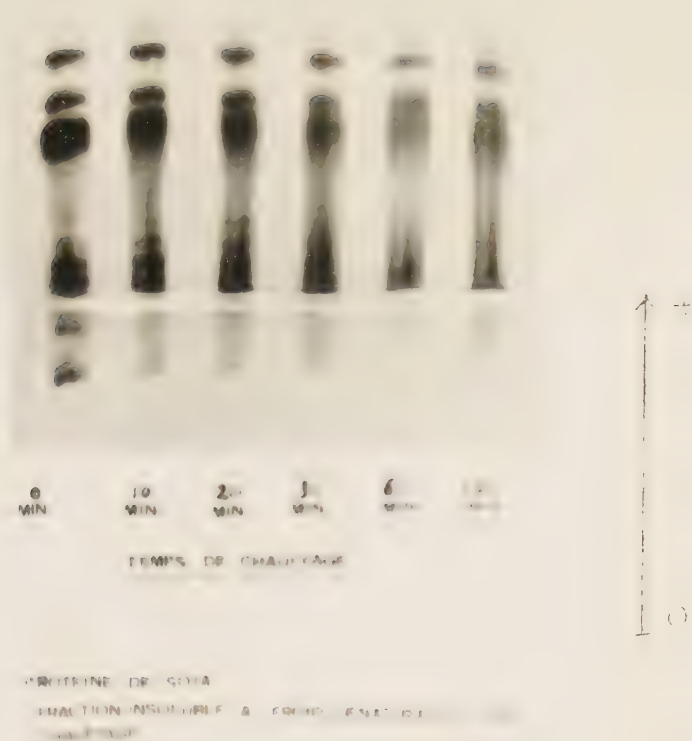


Figure 10 : liagramme d'électrophorèse (voir texte)

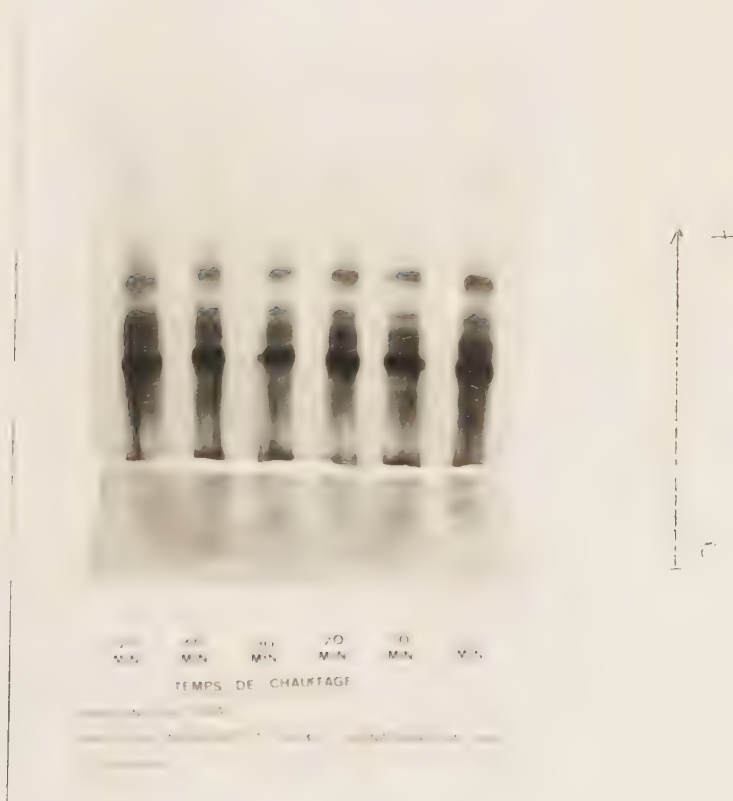


Figure 11 : liagramme d'électrophorèse (voir texte)

Dans la fraction pH 4,5, les modifications observées ressemblent à celles de la fraction PF ; l'apparition d'une zone confuse au niveau des bandes principales est plus tardive (fig.11).

3.1.3.3. - Après dénaturation par l'éthanol

Dans la fraction E.A. on observe déjà une forte modification à la plus petite concentration (5 %); les bandes rapides ont disparu, de même que des bandes situées entre la ligne de départ et le premier constituant majeur; ce sont peut-être des substances hétéroprotéiques alcoolosolubles. A 60 % de concentration en éthanol les bandes principales sont faiblement colorées (la charge sur la ligne de départ reste la même). Avec l'alcool absolu, le diagramme est presque identique à celui de la fraction non traitée ; sans eau, il n'y a pas d'effet de dénaturation ou d'extraction (fig. 12).

Il est possible que l'inhibiteur de trypsine ait disparu par traitement à l'éthanol dilué dans l'eau, mais ceci n'a pas encore été prouvé.

Dans la fraction P.F. on observe aussi 1 disposition de bandes, mais il est possible qu'il y ait non seulement une extraction de substances solubles mais encore une dissociation ou une décomposition beaucoup plus importante. Les trois constituants majeurs dans la zone acide s'atténuent ou disparaissent, avec 10 ou 20 % d'éthanol, car des constituants très rapides apparaissent. Les sous-unités basiques ne sont pas sensiblement modifiées. Lorsque la concentration en éthanol s'élève, on voit de nouveau les principales bandes ; avec quelques modifications dans la zone des constituants lents (fig. 13).

Dans la fraction pH. 4,5 , l'éthanol apporte peu de modifications ; cependant on observe une zone confuse entre la ligne de départ et la principale bande, jusqu'à la concentration de 60 % (fig. 14).

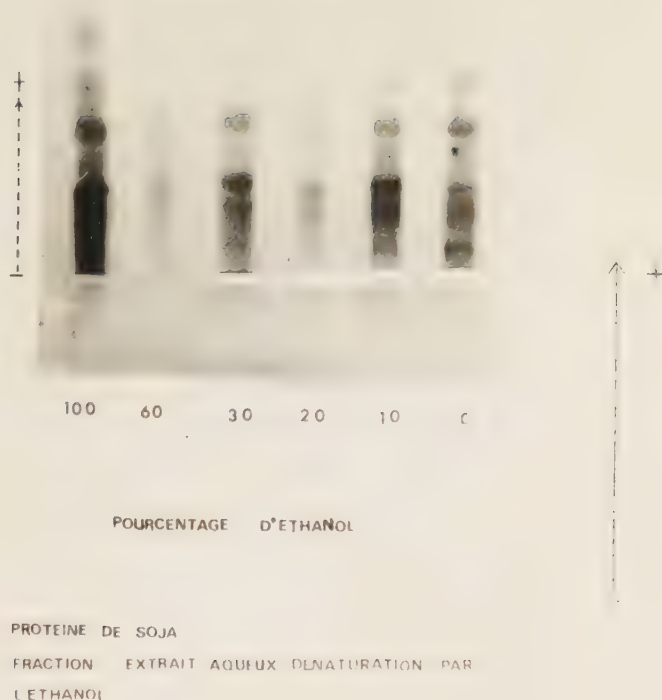


Figure 12 : liagramme d'électrophorèse (voir texte)

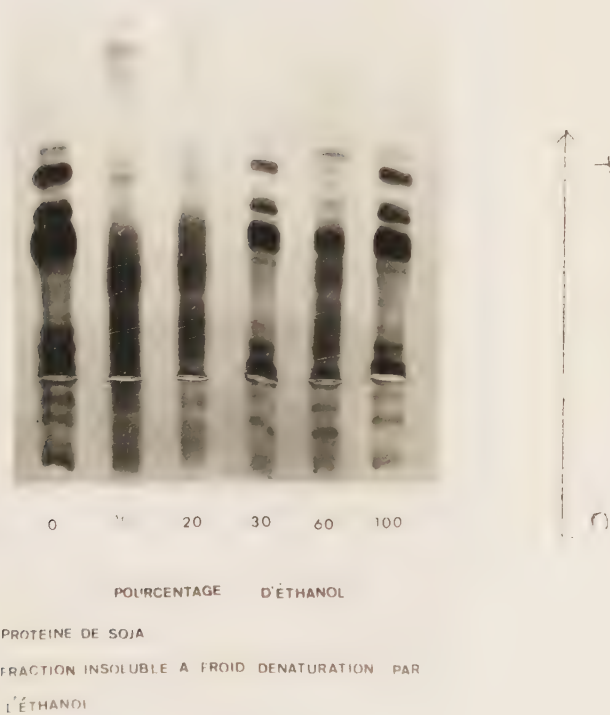


Figure 13 : liagramme d'électrophorèse (voir texte)

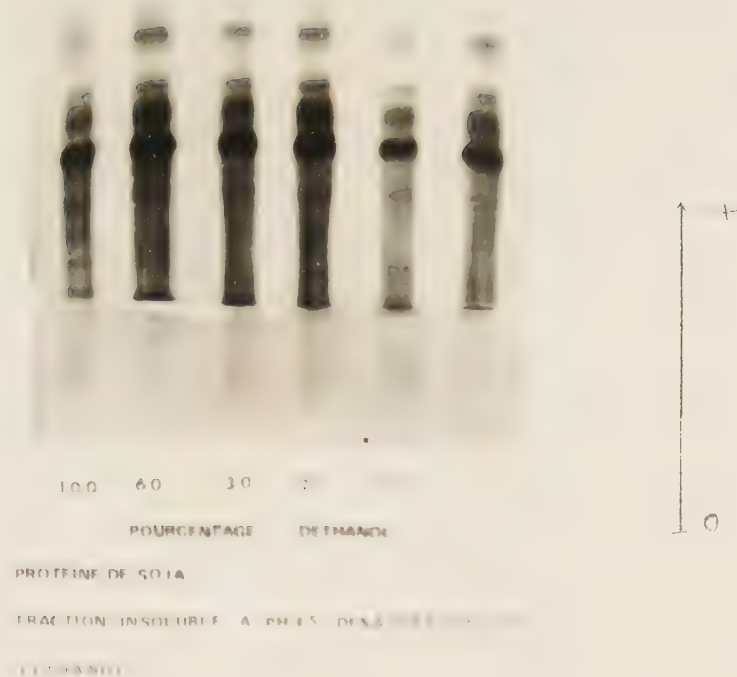


Figure 14 : liagramme d'électrophorèse (voir texte)

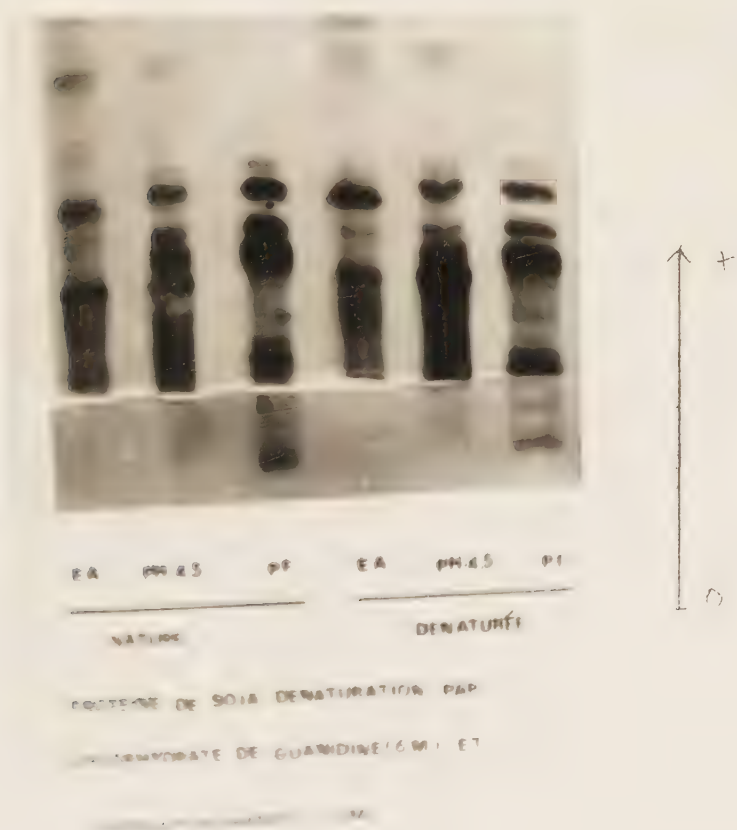


Figure 15 : liagramme d'électrophorèse (voir texte)

3.1.3.4. - Après traitement à la guanidine

La figure 15 montre que les 3 fractions subissent une dissociation qui n'est pas très marquée. Dans la fraction P.F. il n'y a presque pas de modifications ; dans l'extrait aqueux (E.A.), on observe quelques changements parmi les bandes de grande mobilité.

3.2. - DIGESTION ENZYMATIQUE DES PROTEINES NON DENATUREES

Le tableau 4 montre que la fraction insoluble à froid (P.F.) est toujours beaucoup plus fortement protéolysée que les deux autres, et que la pepsine a une action plus poussée que la trypsine. Les fractions EA et pH 4,5 sont digérées sensiblement à un même degré par la pepsine, d'une part, et par la trypsine, d'autre part.

Tableau 4 - Digestibilité in vitro des protéines non dénaturées (*)

	FRACTIONS		
	P F	E A	4,5
NPN - 0	7,8	15,3	3,1
NPN - 2 h			
pepsine	37,07	27,14	25,41
trypsine	20,82	9,52	7,45
NPN - 4 h			
pepsine	39,32	29,27	27,76
trypsine	24,03	9,52	11,16

(*) Moyenne des 3 expériences : NPN-0 : avant digestion (solubilité initiale)

NPN-2h: augmentation après 2 h de digestion

NPN-4h: augmentation après 4 h de digestion

3.3. - INFLUENCE DE LA DENATURATION THERMIQUE SUR LA DIGESTIBILITE

3.3.1. - ACTION DE LA PEPSINE

La figure 16 montre les courbes de protéolyse des fractions chauffées pendant 20 minutes à 100°C ; elles représentent l'augmentation du NPN (NPN - 0 déduit) au cours de la digestion, de 10 minutes à 4 heures à 37°C. On voit que la fraction PF subit la plus forte protéolyse. La vitesse initiale est très élevée ; la digestion se ralentit après 2 heures. La dénaturation, durant 20 minutes à 100° favorise sensiblement la digestion ; l'accroissement de l'azote soluble après 2 heures d'action de la pepsine n'est cependant que 12 %.

Les deux autres fractions sont moins fortement protéolysées, mais dans les deux cas, la dénaturation favorise la digestion ; surtout pour la fraction E.A. (accroissement du NPN après 2 heures de 27 %). La dénaturation de la fraction pH 4,5 n'accroît que très peu la digestion par la pepsine.

La figure 17 présente les variations de l'azote non protéique total : (NPN-0 avant digestion + NPN après 2 heures de digestion pepsique) pour différentes durées de traitement dénaturant à 100°. On voit que c'est vers 20 minutes que la valeur du NPN est la plus forte pour les 3 fractions étudiées. La différence entre la protéine non dénaturée et dénaturée, pour la fraction pH 4,5, est très faible (augmentation NPN total de 29 à 32 %) ; elle est nettement plus grande pour les deux autres ; pour la fraction P.F., augmentation de 45,0 à 52,8 %.

On remarque, avec la fraction E.A., qu'après une dénaturation par chauffage prolongé (1 et 2 heures), la quantité de NPN après digestion est plus faible que dans la fraction non dénaturée (respectivement 35 et 42,6 % NPN). Avec les autres fractions la quantité de NPN libéré par la pepsine, après une longue durée de chauffage est supérieure à celle qui est libérée avant dénaturation.

3.3.2. - ACTION DE LA TRYPSINE

La figure 18 montre que les fraction EA et pH 4,5 sont peu digérées par la trypsine après 2 h de digestion, l'enzyme



Fig. 16

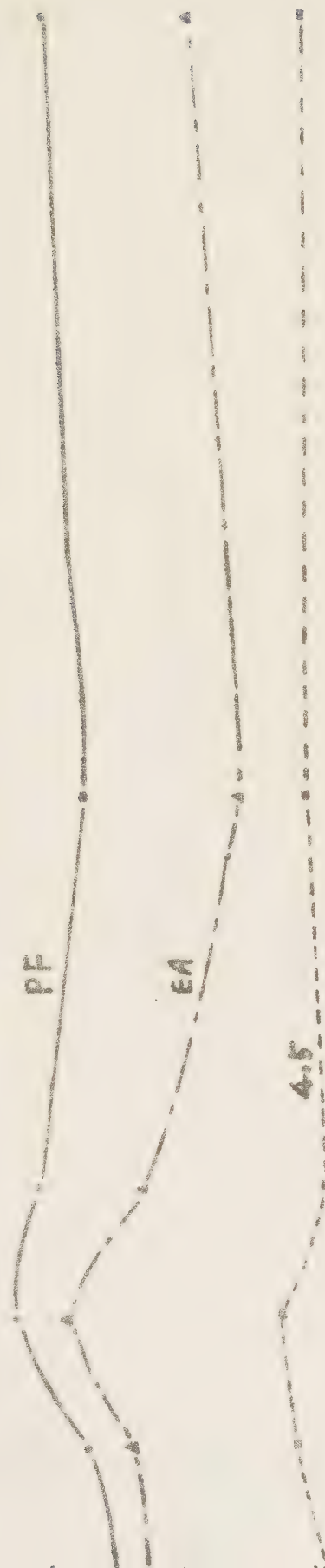
Digestion par la pepsine

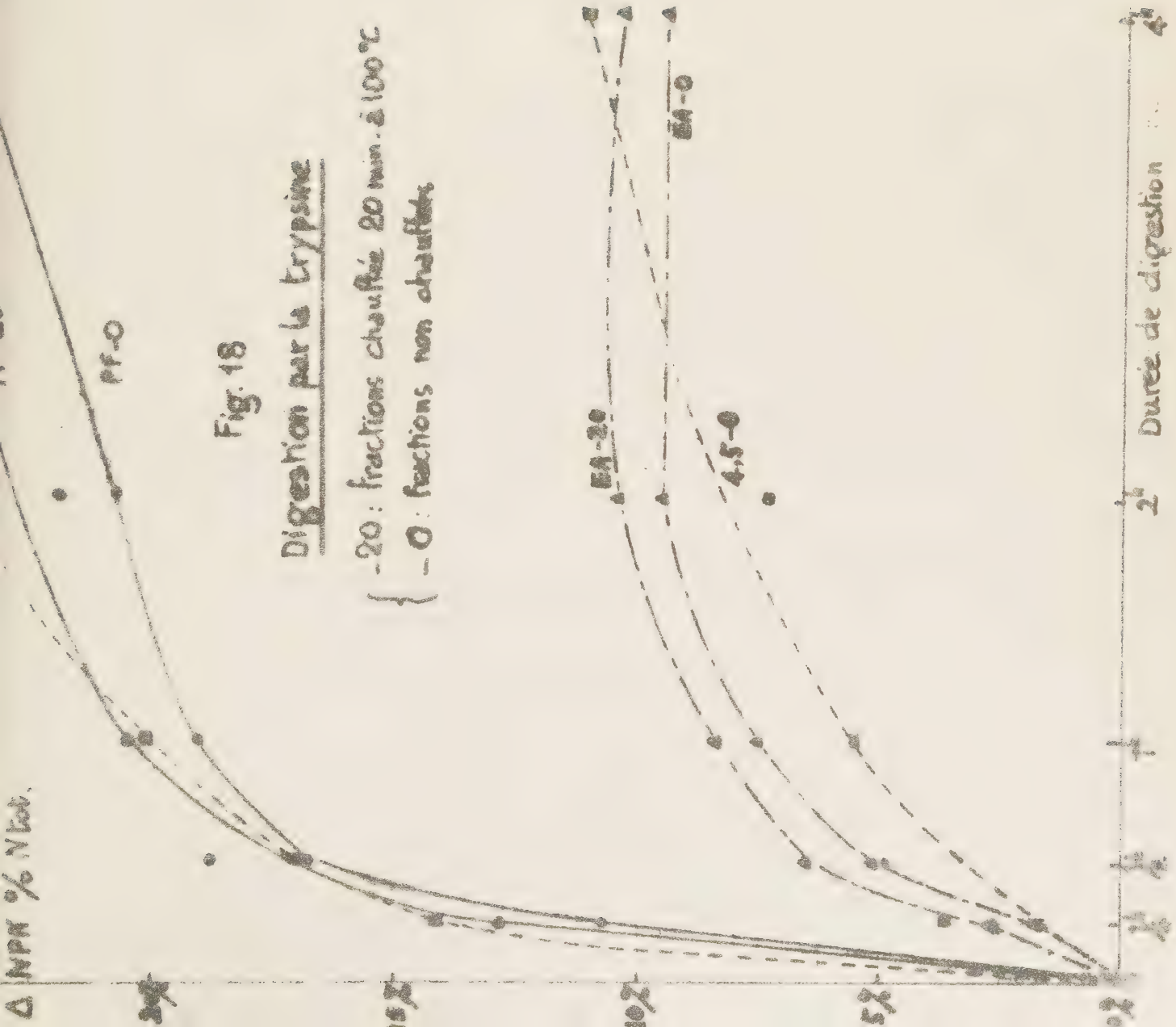
{ -20 : fractions chauffées 20 min à 100°C
 -0 : fractions non chauffées

Fig. 17

Digestion par la pepsine

NPN total après 2 h de digestion
en fonction de la durée de chauffage
à 100°





n'a libéré que 9 et 11 % de NPN, respectivement.

L'effet du chauffage dénaturant est peu marqué pour la fraction E.A., bien qu'elle contienne un inhibiteur de trypsine ; celui-ci ne pourrait pas être détruit entièrement ou inactivé par le chauffage. Par contre, la digestion de la fraction pH 4,5 est considérablement accrue par le traitement thermique. Après 2 heures de digestion, la proportion du NPN passe de 7,5 à 24 %, soit trois fois plus environ.

La fraction R.F. est beaucoup mieux digérée par la trypsine ; après 2 heures de digestion 18 % environ de l'azote se trouve sous forme non protéique ; mais on remarque que la dénaturation thermique n'a qu'un effet très limité sur la protéolyse ; l'accroissement de la libération de NPN n'est que 8 % environ.

La figure 19 présente les variations de l'azote non protéique total après 2 heures de digestion tryptique, pour différentes durées de traitement dénaturant à 100°. Comme dans le cas de la pepsine on observe un maximum pour un traitement de 20 minutes des trois fractions ; mais ici la différence est beaucoup plus forte avec la fraction 4,5 ; pour toutes les durées de chauffage, la proportion de NPN libéré de la protéine dénaturée est 2 à 3 fois plus élevée avec la protéine native. Avec les autres fractions la différence est moins grande, mais la proportion de NPN total est toujours un plus élevée après dénaturation qu'avant.

3. 4. - INFLUENCE DE LA DENATURATION PAR L'ETHANOL SUR LA DIGESTIBILITE

3.4.1. - ACTION DE LA PEPSINE

Les courbes de la figure 20 montrent que la dénaturation par l'éthanol (10%) est certainement très différente de la dénaturation thermique, surtout dans le cas des protéines extraites par l'eau (E.A.). En effet, cette fraction est plus rapidement digérée à l'état natif qu'après traitement par 10 % d'éthanol ;

PN % N tot.

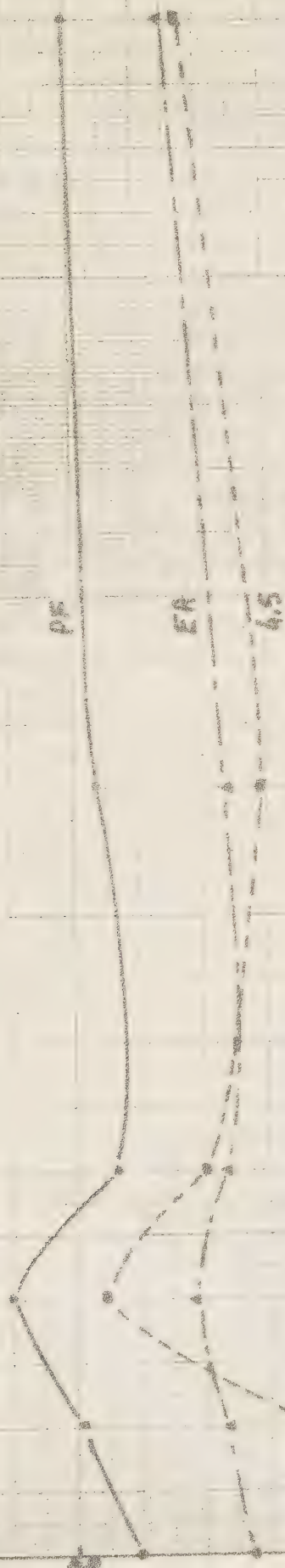


Fig. 19

Digestion par la trypsine

PN total après 2h de digestion
en fonction de l'acidité de chauffage
à 100°C

Δ NPN % N tot.

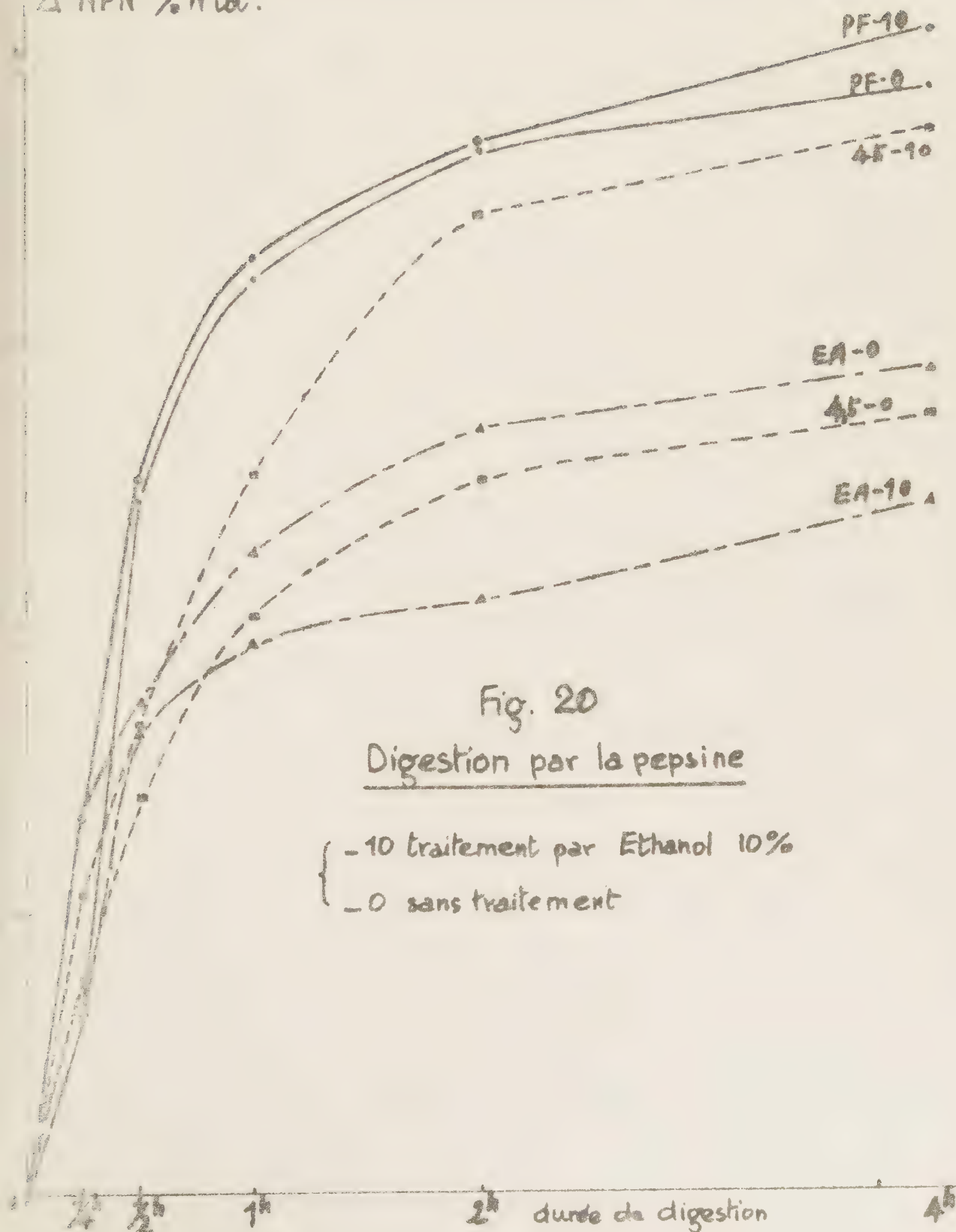


Fig. 20

Digestion par la pepsine

- 10 traitement par Ethanol 10%
- 0 sans traitement

après 2 heures de digestion, la proportion de NPN est respectivement 29,3 et 24,5 % de l'azote total. La fraction PF est peu modifiée, par ce traitement, dans son aptitude à la digestion par la pepsine, mais elle reste la plus sensible à cette enzyme. Quant à la fraction pH 4,5, la dénaturation éthanolique a un effet marqué ; sa digestion est plus rapide et plus poussée après dénaturation qu'avant (après 2 heures de digestion, respectivement 34,8 et 25,5 de NPN % Nt).

Les variations de la quantité totale de NPN, après 2 heures de digestion, pour différents traitements par l'éthanol, sont présentées dans la figure 21. Pour les fractions PF et EA, le maximum se trouve à la plus faible concentration du réactif dénaturant : 10 % ; mais il s'agit principalement d'une modification de la solubilité des protéines dénaturées (fig.7) et non d'un fort accroissement de la digestibilité proprement dite, surtout pour la fraction E.A. Lorsque la concentration en éthanol dépasse 30 %, la proportion de NPN obtenue avec la fraction E.A. devient inférieure à ce qu'elle est avec les protéines natives ; à cause, à la fois de la baisse de solubilité et de la moins bonne digestibilité.

La fraction pH 4,5 se comporte différemment ; on sait que sa solubilité varie peu après traitement éthanolique (fig.7), par contre sa digestibilité par la pepsine s'accroît sensiblement et le maximum se situe à la concentration de 30 % en éthanol.

3.4.2. ACTION DE LA TRYPSINE

Comme avec la pepsine, la fraction E.A. est moins bien digérée après traitement par l'éthanol 10% ; mais de plus, la même chose se produit avec la fraction P.F. (fig.22). Les écarts, dans la proportion de NPN libéré sont notables ; pour la fraction P.F, après deux heures d'action de la trypsine, on observe une baisse de 20,8 à 17,9 % après traitement ; pour la fraction E.A, de 9,1 à 7,1 %. Seule la fraction pH 4,5 voit sa digestion un peu accrue par le traitement à l'éthanol, mais beaucoup moins que par le chauffage (fig.18).

NPN % N tot.

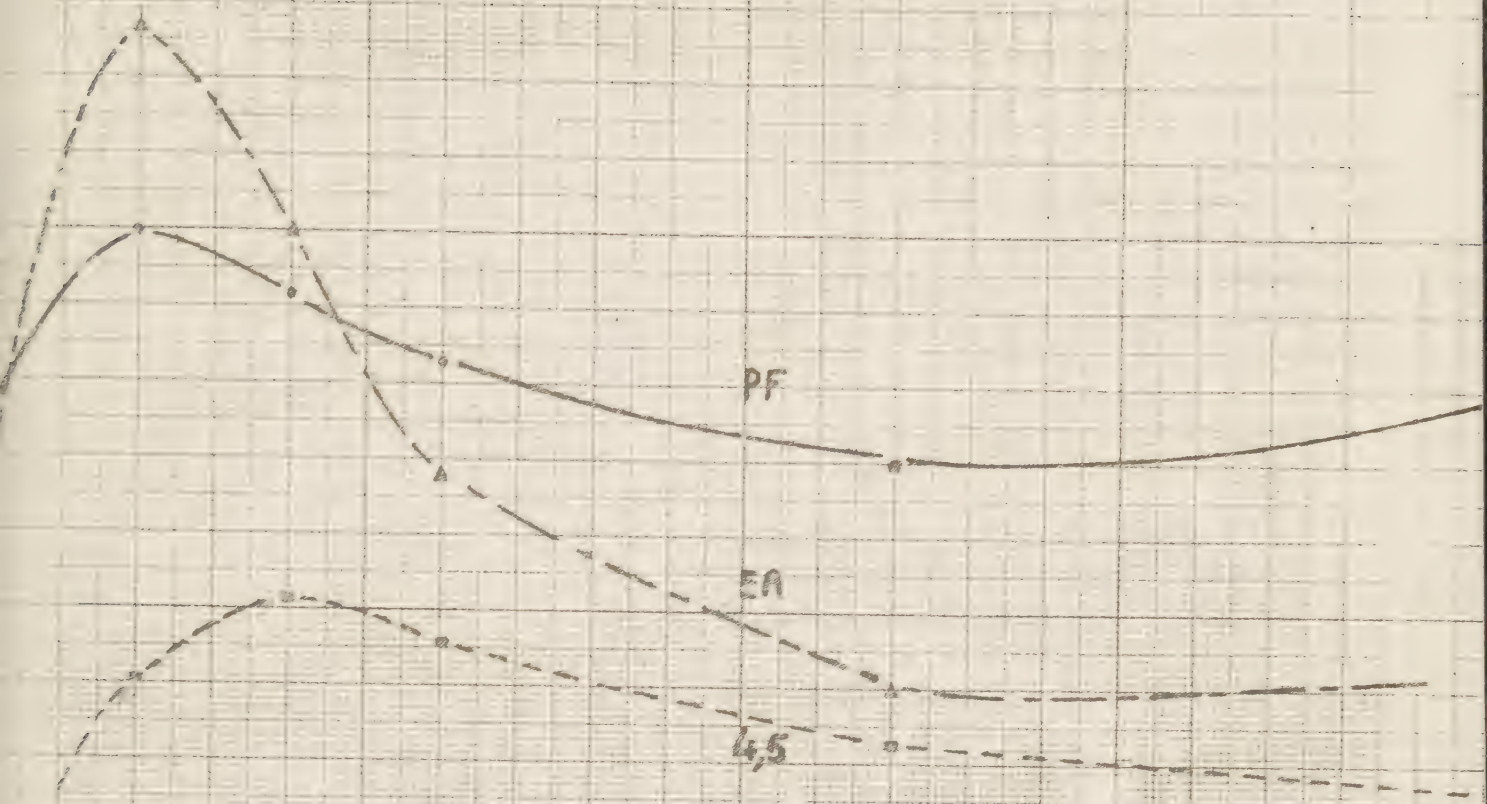


Fig. 221

Digestion par la pepsine

NPN total après 2h de digestion
en fonction du traitement par l'
Ethanol

10%

20%

30%

60%

% Ethanol

Δ NPN % N tot.

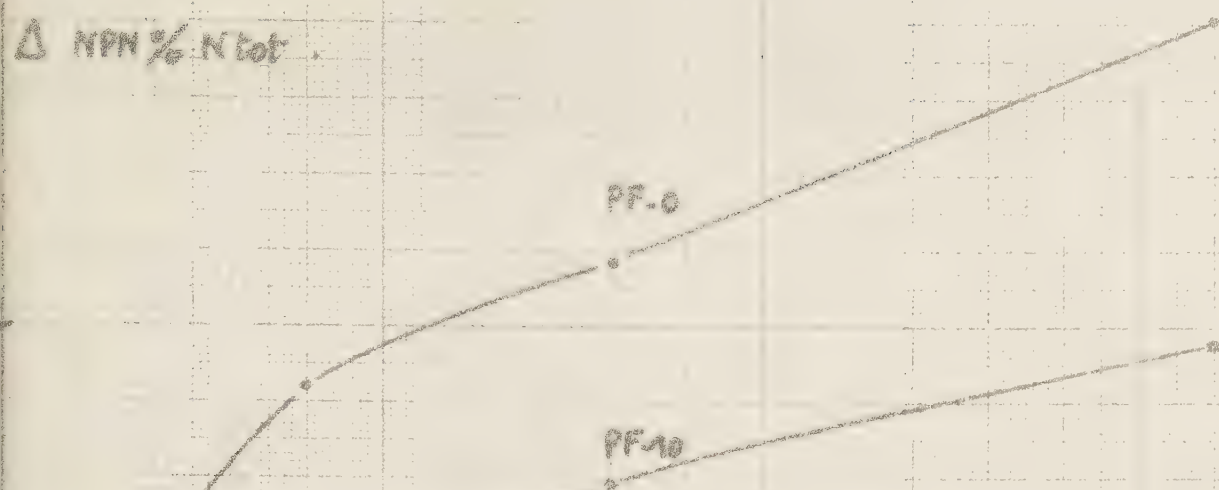
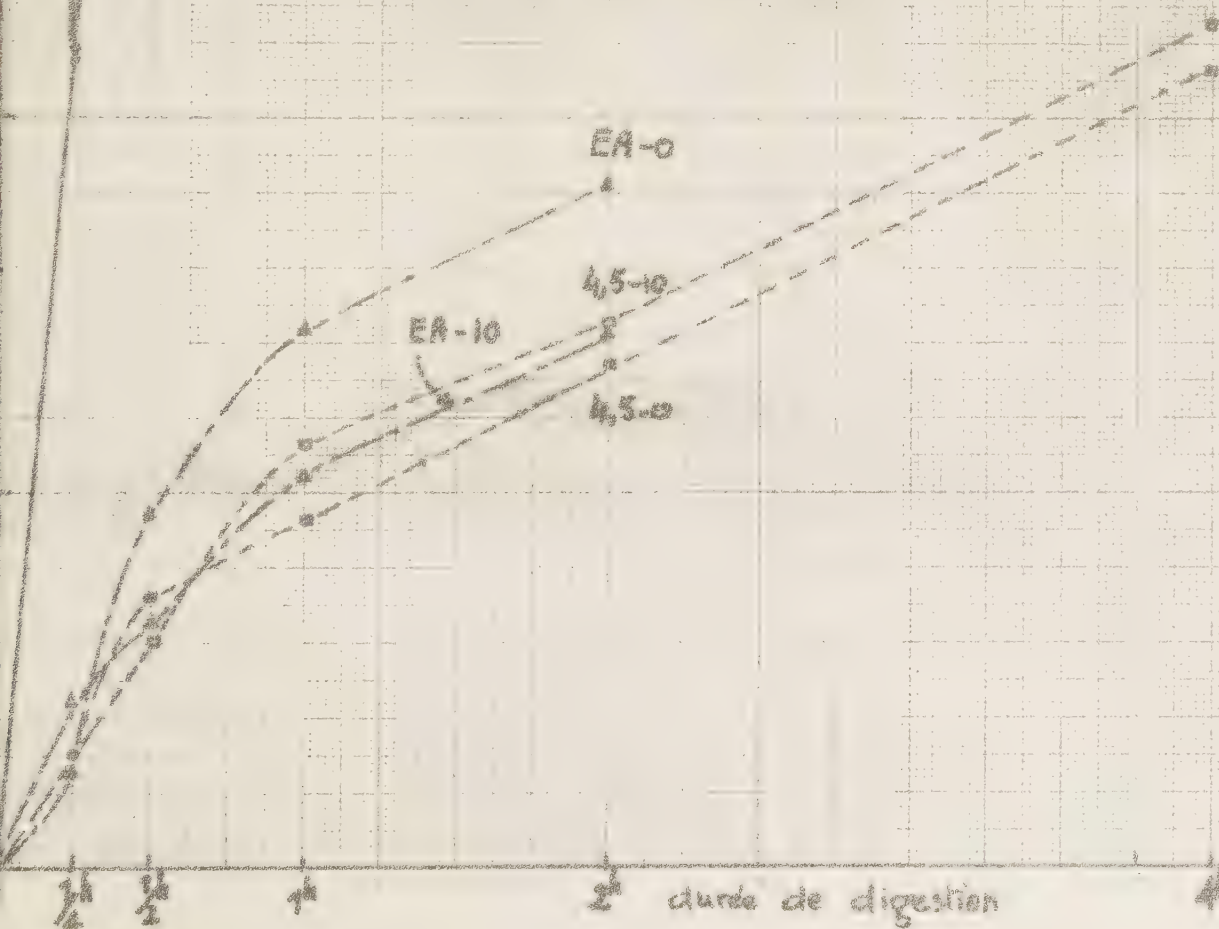


Fig. 22

Digestion par la trypsine

- 10 traitement par Ethanol 10%
- 0 sans traitement



Comme dans les expériences précédentes, nous avons représenté les variations de la quantité totale de NPN, après 2 heures de digestion, en fonction de la concentration du réactif dénaturant. Les courbes de la figure 23 sont comparables à celle de la figure 21 et on peut faire les mêmes observations. La proportion élevée de NPN, avec un traitement par l'éthanol à 10 % pour les fractions P.F et E.A traduit les fortes variations de la solubilité de ces substances consécutives au traitement et non pas un accroissement de la digestibilité par l'enzyme. La fraction E.A est très incomplètement digérée après un traitement par l'éthanol concentré.

3.5. - INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA GUANIDINE ET LE MERCAPTOETHANOL

3.5.1. - ACTION DE LA PEPSINE

Le traitement augmente la protéolyse de toutes les fractions, comme le montre la figure 24. L'augmentation du NPN est particulièrement forte pour la fraction P.F ; après 2 heures de digestion, la proportion passe de 38 à 66 % ; les valeurs correspondantes sont, pour la fraction E.A : 27 et 36 %, pour la fraction pH 4,5 : 25 et 35,5 %.

3.5.2. - ACTION DE LA TRYPSINE

L'effet du traitement sur l'aptitude à la digestion par la trypsine est comparable au précédent ; la protéolyse est favorisée par le traitement et beaucoup plus pour la fraction P.F. que pour les deux autres. Cependant, l'action de la trypsine reste plus limitée que celle de la pepsine. On remarque que la fraction E.A. n'est guère plus digérée après qu'avant traitement par la guanidine (10 et 9 % respectivement).

NPK % N tot

Fig. 23

Digestion par la trypsine

NPK total après 2h de digestion
en fonction du traitement par l'
Ethanol.

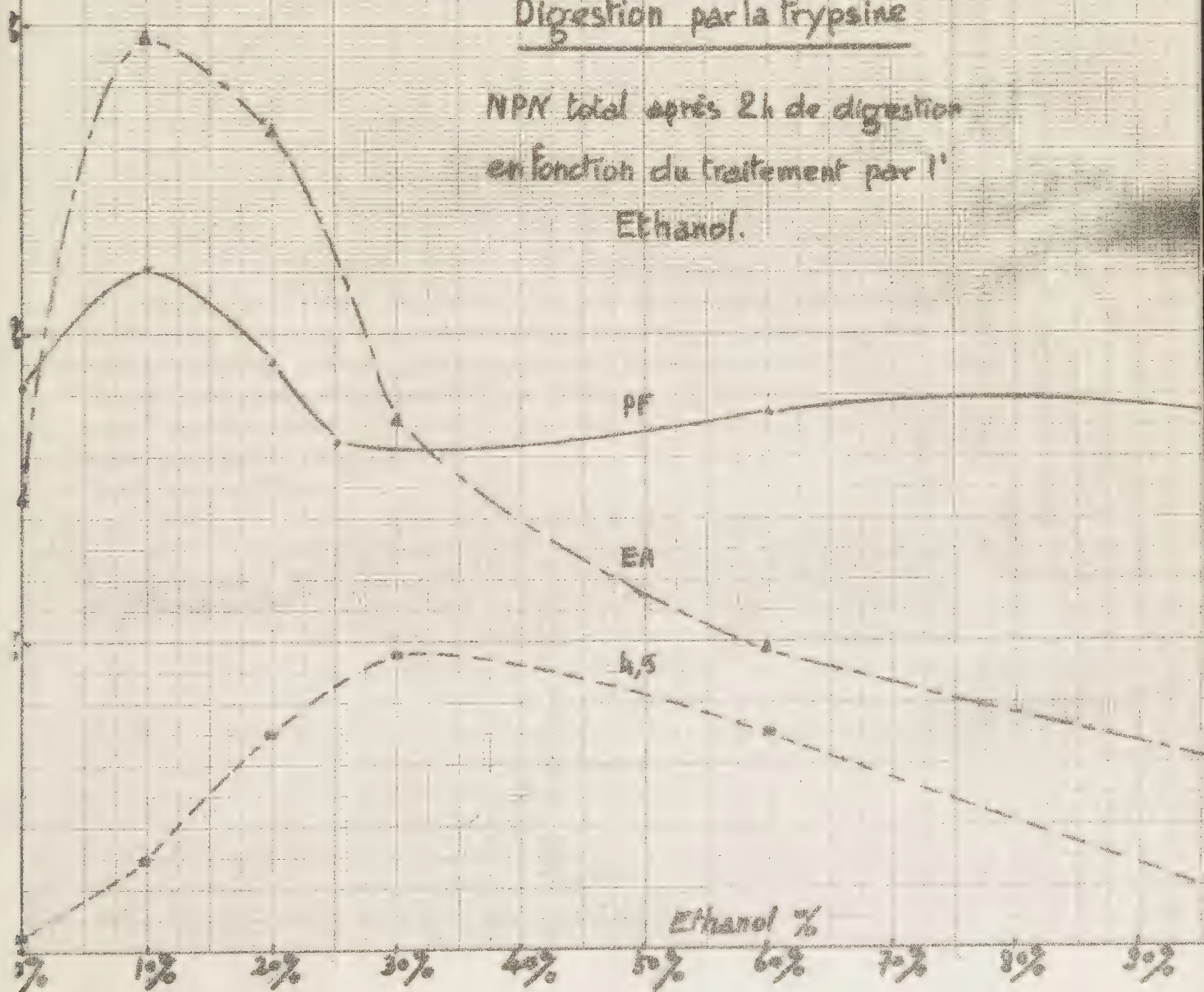
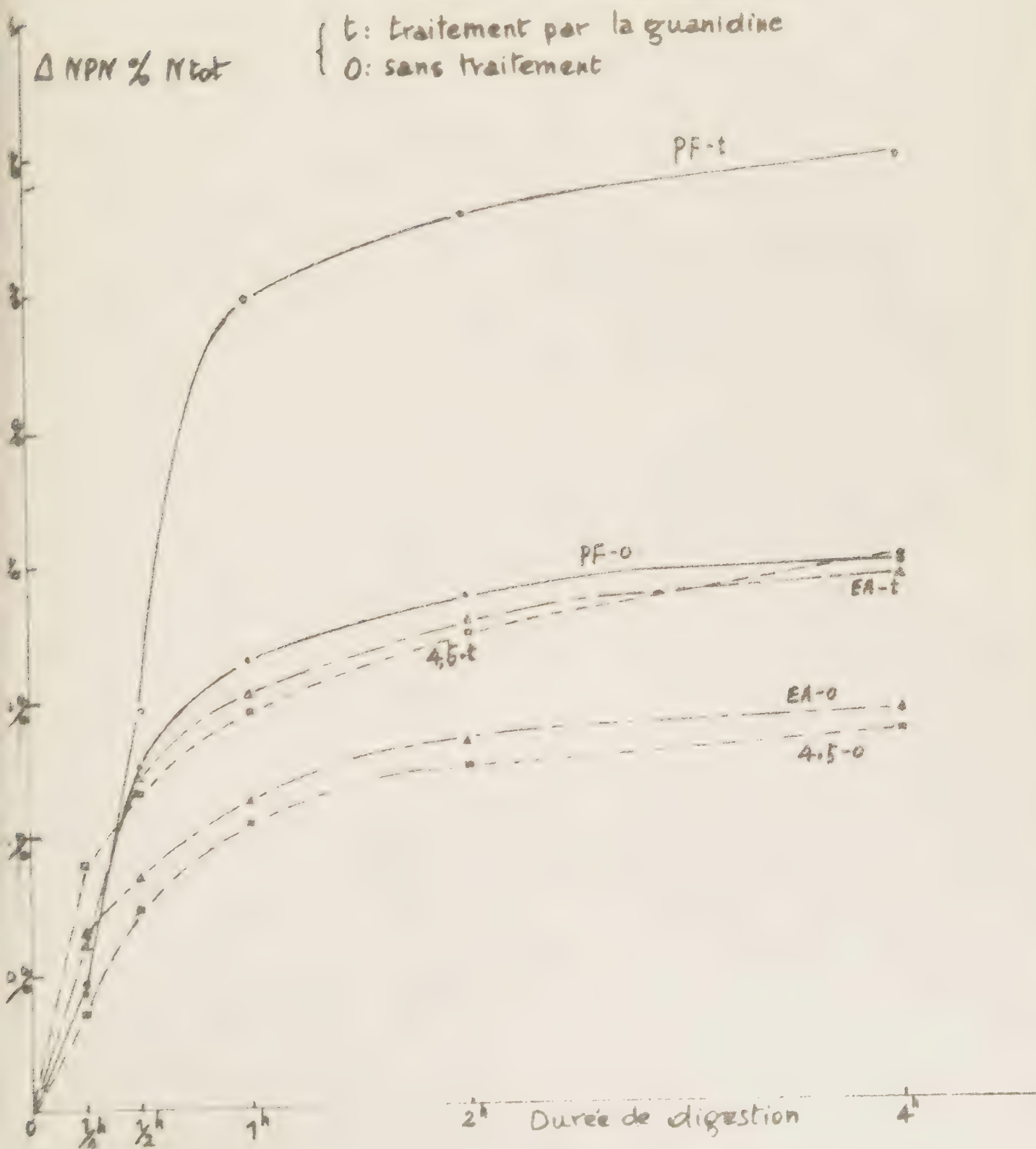
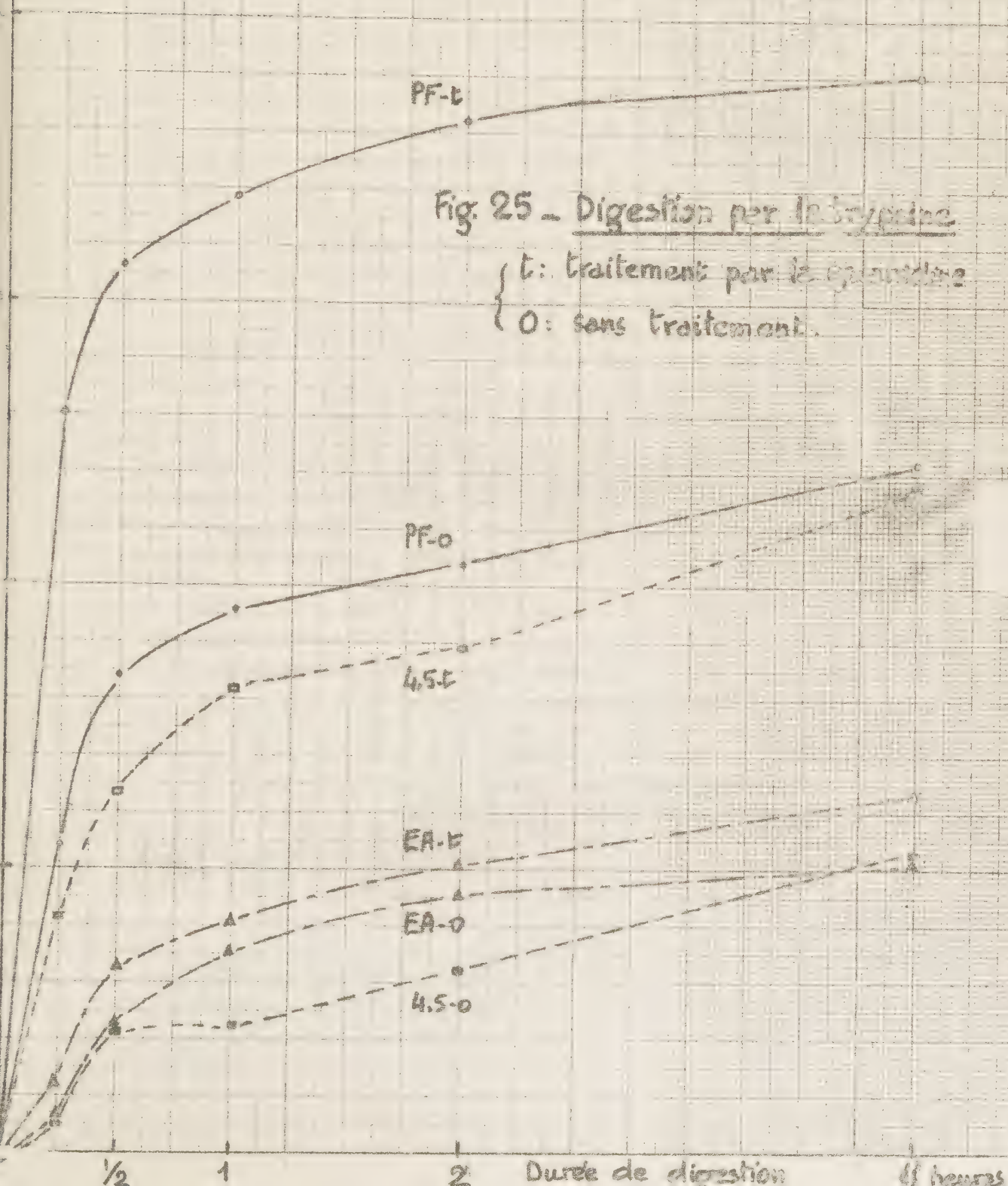


Fig. 24 Digestion par la pepsine





IV - D I S C U S S I O N

4.1. - PROBLEMES DE METHODOLOGIE

L'étude de la digestion enzymatique in vitro d'une protéine implique tout d'abord le choix d'une méthode de dosage des produits résultants de la protéolyse. Les méthodes électrophorétiques et chromatographiques permettent une appréciation de la dégradation de la protéine originelle mais non pas une mesure précise.

Le premier problème est celui de la séparation des produits solubles de la réaction protéolytique. Nous avons utilisé une technique qui a été employée par de nombreux chercheurs ayant étudié des réactions de protéolyse ; la déprotéinisation du mélange réactionnel par l'acide trichloracétique ; on sépare ainsi la protéine non dégradée et éventuellement de gros polypeptides incomplètement digérés. C'est ainsi qu'ont opéré notamment Lorand (72) qui a étudié la protéolyse du fibrinogène par la thrombine et Alais (73,74) qui a étudié l'action de la présure (rennin) sur la caséine. Les conditions de la déprotéinisation ont été particulièrement étudiées par Jacobsen (75) et Alais (76, 77) ; ce dernier recommande l'emploi de l'acide trichloracétique à 12 % de concentration finale. En fait, il n'existe pas de méthode purement chimique permettant une différenciation nette et facile entre protéine intacte et protéine dégradée. Habituellement on appelle "azote protéique" celui qui est contenu dans le précipité après addition d'un réactif des protéines, et "azote non protéique", ou N.P.N., l'azote du surnageant ou du filtrat. C'est une façon conventionnelle d'opérer, mais elle a permis de suivre le cours de diverses réactions enzymatiques d'une manière correcte.

La proportion de NPN est souvent déterminée par des méthodes rapides, comme la simple mesure de la densité optique du filtrat à 280 m μ ou diverses réactions colorées des liaisons peptidiques ou des acides aminés. Nous avons préféré le dosage

de l'azote par micro-Kjeldhal, de façon à avoir une plus grande précision et de pouvoir apprécier de faibles variations du degré de protéolyse.

Une première observation relative à nos résultats, concerne la solubilité dans le réactif déprotéinisant des protéines du soja, avant tout traitement, et que nous avons exprimée sous l'indication "NPN - 0". Le tableau 4, ainsi que l'histogramme de la figure 26 (parties noires) montre que la fraction insoluble à pH 4,5 est peu soluble dans le réactif déprotéinisant (3,11 % de l'azote) ; donc la méthode convient très bien dans ce cas. La fraction insoluble à froid (P.F) est un peu plus soluble (7,8 %), ce qui est encore peu au regard de la solubilisation de l'azote due aux enzymes. L'extrait aqueux (fraction E.A) est sensiblement plus soluble (15,3 %) ; dans certains cas, ce NPN - 0 pourra constituer une partie importante du NPN total, après digestion enzymatique. Dans tous nos résultats nous avons bien distingué NPN - 0 et NPN dû à la protéolyse proprement dite, afin qu'il n'y ait pas de confusion.

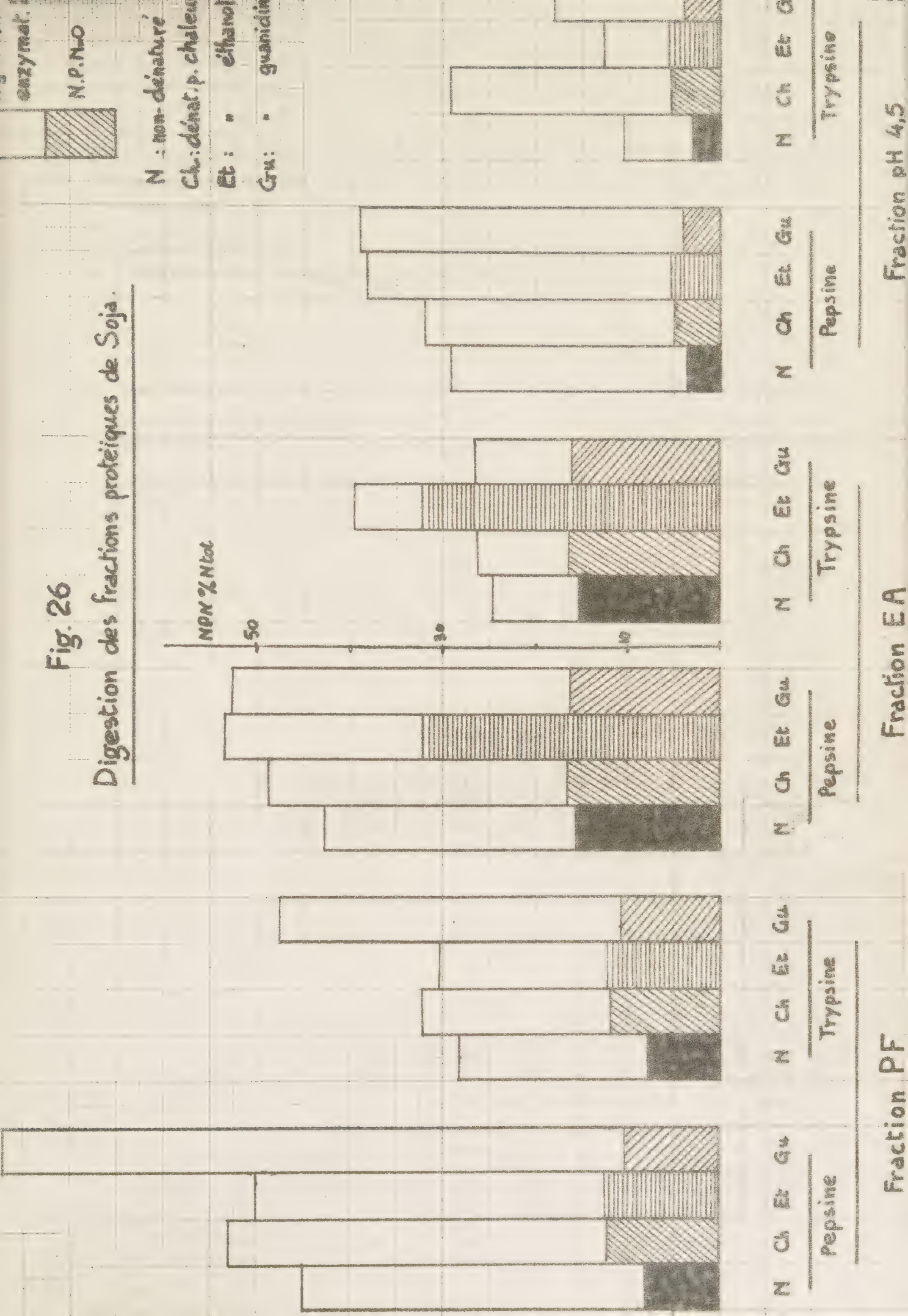
N.B. - Entre temps, nous avons pris connaissance d'une étude japonaise sur la digestion des protéines de soja par une protéase de Aspergillus Sojae, qui utilise également la déprotéinisation par l'acide trichloracétique pour suivre le cours de la protéolyse, mais dans ce cas, le substrat est la farine entière dégraissée.

4.2. - DENATURATION PAR LE CHAUFFAGE

Le chauffage est le traitement le plus important dans l'industrie des produits alimentaires. Il est connu que la protéine de soja, chauffée en milieu aqueux, subit une certaine insolubilisation, avec augmentation de la viscosité (83). Une des principales difficultés de notre travail découle de cette modification ; il faut opérer sous agitation constante et veiller à ce que les prélèvements soient corrects. Une autre difficulté réside dans l'ajustement de pH à une valeur donnée, car les échanges ioniques sont lents et l'on doit attendre la stabilisation.

Fig. 26

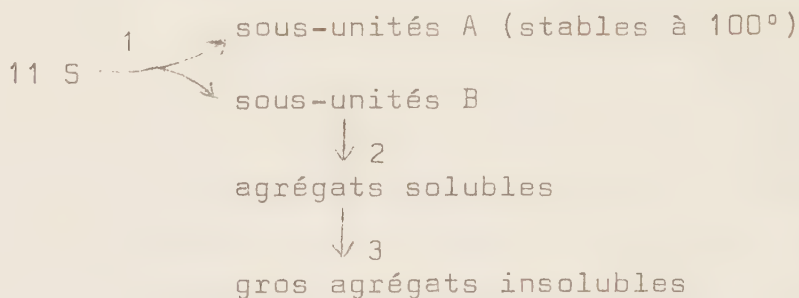
Digestion des fractions proteiques de Soja.



Bien que la température que nous avons choisie pour la dénaturation ne soit pas très élevée (100°C) on observe un brunissement progressif, comme cela se passe dans les milieux contenant des protéines et des glucides et qui subissent les réactions de Maillard. Par contre, l'insolubilisation ne semble être que partielle. Le comportement de ces fractions est très différent de celui des albumines et globulines.

Catsimpoilas et Wolf (39, 93, 99) ont montré que la glycine pure qui est le constituant principal de la fraction de sédimentation 11 S, est stable jusqu'à vers 70° et qu'elle est précipitée complètement vers 90°. Dans notre fraction P.F. cette protéine se trouve accompagnée d'impuretés, ce qui peut gêner sa précipitation, d'autant que l'on opère à faible concentration (0,8%).

L'évolution de la solubilité de la fraction 11 S a été étudiée et par Wolf et Tarnura (84) qui a donné une explication du phénomène, comme l'indique le schéma :



Plus le chauffage est prolongé, plus la partie insoluble s'accroît. On peut prévoir que la digestion enzymatique sera la meilleure après un chauffage modéré, lorsque les protéines seront à l'état n° 2, ce que nous avons vérifié pour un chauffage de 20 minutes à 100°, comme nous le verrons plus loin. Les agrégats insolubles ne sont probablement pas attaqués rapidement par les protéines.

La solubilité dans l'acide trichloracétique est peu augmentée dans le cas des fraction E.A. et pH 4,5, le traitement thermique ne provoque donc pas une dégradation notable. La fraction P.F. donne sensiblement plus de N.P.N. après

chauffage qu'avant, ce qui révèle soit une dégradation par coupure de liaisons peptidiques fragiles, qui serait sans doute très limitée soit la dissociation d'un constituant de faible poids moléculaire, lié à la masse protéique dans la protéine native. L'électrophorèse montre en effet la disparition des sous-unités alcalines de la fraction 11 S qui nous le savons, est le constituant principal de la partie insoluble à froid (P.F.).

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature des travaux comportant l'examen électrophorétique systématique des protéines de soja dénaturées. Catsimpoolas et Al. (39) ont observé, avec la glycinine pure, la dissociation partielle en plusieurs sous-unités après chauffage et traitement à des valeurs extrêmes de pH. Avec nos fractions chauffées nous avons plutôt observé des confusions de bandes et des zones avec des traînées. Avec la fraction E.A., il y a une perte de substance colorable évidente, peut être par dégradation, peut-être par modification de l'aptitude à la coloration, comme cela se produit avec les caséines chauffées à 120° ainsi que l'a observé Lorient (85).

4.3. - DENATURATION PAR L'ETHANOL ET LA GUANIDINE

L'éthanol est utilisé en pratique pour traiter la farine de soja, en vue de modifier sa couleur et sa saveur. Ce traitement améliore les qualités organoleptiques et techniques des protéines de soja ; il permet en particulier d'obtenir la formation de mousses stables (87), comme avec le blanc d'oeuf, ce qui est intéressant pour l'utilisation en boulangerie, biscuiterie, etc...(88). Dans la méthode traditionnelle chinoise pour le fromage on ajoute de l'alcool à la saumure, ce qui améliore la saveur et, peut-être, la digestibilité (89,90,91).

L'alcool extrait les glucides et certains autres constituants (86,95), mais il ne dissout pas les polysaccharides ni les protéines ; il provoque la séparation des phospholipides qui restent dans les protéines délipidées par les solvants non nuisibles à l'eau, comme l'a montré Ebridge et Wolf (86,94). Nous avons en effet observé la formation d'une phase insoluble légère après traitement de nos fractions par l'éthanol. La couche de type phospholipidique est maximum avec la fraction pH 4,5 et à 60 % d'éthanol.

Nous avons observé que les modifications de nos fractions par l'éthanol dépendent beaucoup de la concentration. Sauf pour la fraction pH 4,5, c'est à 10 % d'éthanol que l'augmentation de l'azote non protéique est la plus élevée et que les diagrammes d'électrophorèse sont le plus modifiés.

Les fractions P.F. et E.A. sont plus fortement modifiées par l'éthanol. A 10 % de concentration, on observe une augmentation importante de la proportion des substances azotées solubles dans l'acide trichloracétique et de grands changements dans le diagramme d'électrophorèse. Il est évident que les constituants les plus abondants de la fraction P.F. (glycine) sont dissociés et se retrouvent sous forme de sous-unités plus et moins mobiles que le complexe. Les modifications subies par la fraction E.A. sont différentes ; une partie des substances colorées dans le diagramme d'électrophorèse a disparue. Lorsque la concentration en éthanol est élevée, la dénaturation ne se produit plus ; la protéine conserve l'état natif et la solubilité dans le TCA n'est guère modifiée.

La dénaturation des protéines du soja par divers solvants organiques a été étudiée d'une manière systématique par Futhishima (35). Les alcools de bas poids moléculaire sont plus actifs que les autres solvants miscibles. Le mélange eau-alcool possède une forte capacité de dénaturation que ne peut atteindre chacune de ces deux substances. L'alcool doit détruire la structure interne en rompant les liaisons hydrophobes qui la stabilise et permettre une augmentation de la sensibilité aux protéases.

La guanidine en solution concentrée, associée au mercaptoéthanol, est un réactif dissociant typique, mais elle semble n'avoir que peu d'effet sur les fractions protéiques du soja, dans les conditions de nos expériences, la solubilité dans le TCA varie peu et l'électrophorèse ne révèle pas de changement notable. Un réactif ayant des propriétés voisines, l'urée, a été utilisé pour l'étude de la dissociation de la glycine (39,79,80); à la concentration de 6 M, cette protéine se dissocie de façon irréversible ; nous n'avons ^{pas} observé le même phénomène avec la fraction P.F. et 6 M de guanidine.

4.4. - DIGESTION DES PROTEINES NATURES ET DENATUREES

Nous n'avons pas trouvé de références sur la digestion in vitro des fractions protéiques de la farine de soja par les enzymes digestifs. Ce qui semble avoir été le plus étudié c'est un traitement enzymatique de la farine de soja par des protéases ~~fon~~giques, du type aspergillopeptidase. Les traitements ont pour but, soit de faire une prédigestion, soit hydrolyser les peptides qui provoquent l'amertume ou d'autres défauts de flaveur dans les produits à base de soja (81,27,29).

Dans un cas, la pepsine et la trypsine ont aussi été utilisées dans ce but (82).

La figure 26 présente, sous forme d'histogramme, un résumé des résultats après 2 heures de digestion. On voit de suite que, parmi les 3 fractions non dénaturées, la fraction insoluble à froid (P.F.) est la plus sensible aux deux protéases utilisées ; on peut aussi noter que c'est la fraction la plus pure. Dans le cas de la trypsine, la quantité de NPN libérée est plus de deux fois plus forte avec la fraction P.F. qu'avec les fractions E.A. ou pH 4,5. Le résultat avec E.A. s'explique si l'on considère que les inhibiteurs de trypsine se trouvent dans l'extrait aqueux ; par contre la fraction pH 4,5 ne contient pas d'inhibiteur connu. Le seul point à souligner est que cette dernière fraction est beaucoup moins pure que P.F.

Le chauffage modéré favorise la digestion des 3 fractions par les deux enzymes, mais d'une manière irrégulière. L'accroissement de la protéolyse est très limité dans le cas de la fraction pH 4,5 avec la pepsine et de la fraction E.A. avec la trypsine ; il est assez important dans le cas de la fraction E.A. avec la pepsine et surtout avec la fraction pH 4,5 (qui ne contient pas d'inhibiteur) avec la trypsine.

Il est certain que ce n'est pas seulement l'inactivation d'un inhibiteur qui peut expliquer l'amélioration de la digestion par le traitement thermique. La dénaturation proprement dite, qui détruit la structure dans l'espace et rend

disponible le soufre de la cystéine, est la principale raison de l'amélioration comme de la valeur nutritive par le chauffage.

Un chauffage prolongé des protéines peut ramener le taux de digestion au niveau de ce qu'il était dans la protéine naturelle et même parfois en-dessous (voir fig. 17). Il s'agit probablement de l'effet de l'insolubilisation partielle des protéines. On peut dire qu'un traitement thermique prolongé représente, au niveau de l'industrie, une perte d'énergie, donc d'argent. Un chauffage modéré est préférable.

Le traitement par l'éthanol a un effet qui n'est pas parallèle à celui du chauffage. La digestibilité de la fraction E.A. par la pepsine et par la trypsine est diminuée; c'est cette fraction qui est la plus insolubilisée par le traitement à 10 % d'éthanol. Dans la digestion par la trypsine il n'y a que la fraction 4,5 qui bénéficie d'un léger accroissement de la protéolyse ; cette même fraction est par contre rendue nettement plus sensible à la pepsine. Naturellement, la forte augmentation de la solubilité dans le TCA de la fraction E.A., dont la dissociation est confirmée par l'électrophorèse, entre en ligne de compte et, au total, le traitement par l'alcool dilué doit augmenter la digestibilité des protéines du soja.

Le traitement à l'alcool concentré, à partir de 40 %; n'est pas à conseiller ; il n'y a que la fraction pH 4,5 qui peut être traitée sans inconvénient vers 50° .

Fukushima (96) a observé que la protéolyse des protéines totales du soja, par des protéines fongiques, surtout d'Aspergillus, est un peu améliorée par le traitement à l'éthanol.

En ce qui concerne la guanidine, nous avons observé un effet marqué sur la digestion, bien que les fractions ne paraissent pas être sensiblement modifiées par le traitement, comme nous l'avons vu plus haut . L'augmentation du taux de protéolyse est particulièrement grand avec la fraction P.F. ;

la proportion de NPN libéré par la pepsine et par la trypsine est environ 1,8 fois plus forte qu'avant traitement. Dans un cas cependant (la fraction E.A. avec la trypsine), l'effet du traitement est très faible.

La fraction P.F., dont la digestibilité est si fortement accrue par ce traitement, est riche en glycine substance a été particulièrement étudiée, au point de vue de sa dénaturation, par Catsimpoolas et Coll. (93) ; ces auteurs ont observé par les méthodes spectroscopiques, des changements de conformation à la suite du traitement par l'urée ou par le chlorhydrate de guanidine en solution concentrée. Ces réactifs rompent les liaisons hydrogènes et les forces secondaires qui relient les chaînes protéiques entre elles ; le démasquage progressif des groupes de la tyrosine et du tryptophane a été mis en évidence. De plus, le mercaptoéthanol provoque la rupture des ponts disulfures, qui interviennent dans la structure tertiaire. Ces effets expliquent aisément le bénéfice que l'on tire, au point de vue de la digestibilité, du traitement par ces réactifs .

Nous comptons reprendre l'étude des effets de la guanidine sur des fractions de la protéine de soja, après réduction et blocage des groupements par S-carboxyméthylation (97) ou par aminoethylation (98) .

V - R E S U M E

1. - Nous avons étudié la dénaturation et la digestion in vitro de fractions protéiques de la farine de soja. Ces fractions ont une composition caractéristique et il est possible de les obtenir industriellement ; elles ont un grand intérêt pour les technologistes alimentaires. La fraction insoluble à froid (PF) contient surtout la glycinine 11 S ; la fraction extraite par l'eau (EA) contient principalement les parties 2 S et 7 S à côté d'un peu de 11 S ainsi que les inhibiteurs de trypsine ; la fraction insoluble à pH 4,5 contient les protéines précipitées en milieu acide (globulines), elle est exempte d'inhibiteur.

2. - Avant tout traitement, ces fractions ne sont pas protéolysées de la même manière par les deux enzymes du système digestif que nous avons utilisées : pepsine et trypsine. La fraction P.F. est la plus sensible ; avec la trypsine la digestion de cette fraction est deux fois plus rapide que celle des fractions E.A. et pH 4,5 .

3. - Ces fractions ont été soumises à différents traitements connus pour leurs effets dénaturants en dissociants : chauffage à 100°, traitement par l'éthanol, traitement par la guanidine et le mercaptoéthanol. Ils ont pour but final d'améliorer la digestibilité, la valeur nutritive et les qualités organoleptiques des protéines de soja.

L'étude de la dénaturation et de la digestion enzymatique est basée sur le pourcentage d'azote non protéique (NPN), défini comme l'azote soluble dans 12 % d'acide trichloracétique ; nous avons discuté les conditions de la déprotéinisation. En outre, l'effet de la dénaturation est apprécié par le moyen de l'électrophorèse en gel d'amidon, en milieu dissociant et réducteur. La fraction pH 4,5 est peu soluble dans le TCA (3 %), la fraction PF l'est un peu plus (7 %) alors que la fraction EA est assez soluble (15 %) avant tout traitement.

4. - Le traitement thermique modifie toutes les fractions, dans l'aspect des solutions (brunissement et insolubilisation progressive), dans le diagramme d'électrophorèse (disparition et confusion de bandes) et dans la solubilité dans le TCA qui est accrue ; surtout pour la fraction P.F. La digestion enzymatique est favorisée dans tous les cas lorsque la durée du chauffage n'est pas trop longue, mais d'une façon différente selon les fractions. L'accroissement de la vitesse de protéolyse est notable pour la fraction P.F. avec les deux enzymes ; il est très limité dans le cas de la fraction E.A. avec la trypsine et de la fraction pH 4,5 avec la pepsine. Un chauffage modéré est plus avantageux qu'un chauffage prolongé, pour améliorer la digestibilité des fractions.

5. - Le traitement par l'éthanol a un effet marqué sur les propriétés des fractions lorsque le réactif est peu concentré, 10 - 20 %. La fraction E.A., la plus fortement insolubilisée, voit sa vitesse de digestion par les deux enzymes réduite. Avec la trypsine, seule la fraction pH 4,5 bénéficie d'une faible accélération de la protéolyse ; avec la pepsine l'effet est plus marqué. Le traitement à l'éthanol concentré (50 % et au-dessus) n'est pas à conseiller.

6. - La guanidine et le mercaptoéthanol ne modifient guère les diagrammes d'électrophorèse, ni la solubilité ; cependant, l'effet sur la protéolyse enzymatique est notable, surtout avec la fraction P.F. : la proportion de NPN libérée par les deux enzymes est 1,8 fois plus élevée qu'avant le traitement.

7. - Nos résultats montrent que la digestibilité des fractions de la protéine peut être accrue par les traitements dénaturants. Cet effet ne doit être dû que secondairement à l'inactivation d'inhibiteur ; il est principalement le résultat de la modification des structures des protéines et de la dissociation de complexes.

VI - B I B L I O G R A P H I E

- (1) CATSIMPOOLAS N. CAMPBELL T. GAND MEYER EW. - Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds. plant physiology, Vol. 43 N° 5, May 1968 pages 799-805.
- (2) CATSIMPOOLAS N. KENSTAM C.E. et AL. - Protéine subunits in Dormant and germinating soybean seeds. Biochimica et Biophysica acta. 158 (1968) 122 - 131.
- (3) MORAN F.E. proc Intern conf : on soybean protein foods. peoria Ill U.S.A. 1966 northern utilization R & D. Div. RYS.
- (4) DAVISON A.G. Soybean and grundnut protein. - nutritional value, application acceptability. unilever research laboratory Bedford.
- (5) ELDRIDGE A.C. WOLF W.J. et al. - Alcohol washing of soybean protéin. agr. and food chemistry Vol II july-august 1963 p. 323 - 8.
- (6) WOLF W.J. ELDRIDGE A.C. et al. - Physical properties of alcohol - extracted soybean proteins. Cereal chem. vol. 40 N° 5. September 1963.
- (7) KYOKO SAIO, EMIKO KOYAMA AND TOKUJI WATANABE. Protein - calcium - phytic acid relationship in soybean part I. Agr. Biol. Chem. Vol. 31 N° 10 p. 1195 - 1200, 1967.
- (8) KYOKO SAIO, EMIKO KOYAMA AND TOKUJI WATANABE. - Protein - calcium - phytic acid relationship in soybean part II. Agr. Biol. Chem. Vol. 32, N° 4, p.448 - 452, 1968 .
- (9) SYLVIA MIZRAHI, ZEKI BERK ET URI COGAN . - Isolated soybean protein as a Banana spray-Drying aid cereal science today. N° 8 Vol. 12 August 1967 p. 322.

- (10) SOY FIBERS - a new approach to vegetable protein acceptability . - nutrition reviews p. 305 - 307 1967.

- (11) RAKOSKY J. Jr., Ph.D. "Soybeans for new improved candies ?" The manufacturing confectioner, February 1969.

- (12) CHURCH J.A. and B.A.F. Chivers. - Sojaifoods, new Bermondsey factory food trade review, april 1970.

- (13) SUSANNE DAVIS KOURY And ROBERT E. HODGES M.D.
Soybean protein for human diets ?. - Journal of the american dietetic association Vol. 52. august 1967.

- (14) International action to avert the impending protein crisis report to the economic and social council of the advisory committee on the application of science and technology to development. un publication, Sales N° E 68 XIII 2.

- (15) BOYD OYY. E and ADAIR D : The production of protein foods and concentrates from oilseeds. Tropical products institute, Report 6. 31. London 1967.

- (16) TERUO TANAKA and NOBUS SAITO "studies on sensory evaluation of soy sauce. J. ferment technol., Vol. N° 12, p. 780 - 789, 1969.

- (17) HELEN A. MOSER. Co. EVANS et al. - Sensory evaluation of soy flour. page 296 Vol. 12 N° 7 july 1967. cereal science today.

- (18) CATSIMPOOLAS N. and MEYER E.W. - Gelation phenomena of soybean globulin. cereal chem. sept. 1970. Vol. 47 N° 5.

- (19) SOICHI ARAI, MASATOSKI NAGUCHI et al. studies
on flavor components in soybean part. VI. Agr.
Biol. Chem., Vol. 34 N° 10 P. 1569-1573, 1970.
- (20) W.F. WILKENS, A.F. BADENHOP et AL. - Lipoxidase
and flavor formation. New-York state Agricultu-
ral Experiment Station cornell.university Geneva
N.Y.
- (21) JOSEPH J. RACKIS, DAVID H. HONIG et AL. - Flavor
and flatulence factors in soybean protein pro-
ducts. agr. food. chem. Vol. 18, N°6, 1970 - 977.
- (22) MASAO FUJIMAKI, HIROMICHI KATO. - Soichi Arai and
Escolastica Tamaki. Applying proteolytic enzy-
mes on soybean. Vol. 22. 889, food Technology,
july 1969 - 68-77.
- (23) Diffusable Bitter peptides in peptic hydrolyzate
of soybean protein. Agr. Biol. Chem. Vol. 32.
N° 6, p. 794 - 795, 1968.
- (24) SOICHI ARAI, MICHUKO YAMASHITA et AL. - Applying
proteolytic enzyme on soybean. part. II. Agr.
Biol. Chem. Vol 34. N° 5, p. 729 - 736, 1970 .
- (25) E.L. SMITH . - Advances in enzymology. Vol. 12
ed. FF Nord interscience publishers Inc.,
New-York 1951, p. 191.
- (26) H. SUGIMOTS and J.P. VAN BUREN. - Removal of oli-
gosaccharides from soymilk by an enzyme from
aspergillus saitoi. 656 - journal of food scien-
ce - vol. 35, 1970.
- (27) MASATOSHI NOGUCHI, SOICHI ARAI et AL. - Applying
proteolytic enzyme on soybean. Vol. 35 (1970)
journal of food science -211.

- (28) BERTHA J. RIOS IRIARTE AND RICHARD H. BARNES. - The effect of overheating on certain nutritional properties of the protein of soybean. june 1966 - food technology (835) 131.
- (29) IROSHISEKINE, SERICHI NASUNO AND NOBUYOSHI IGUCHI. - Digestion of soybean protein by the proteolytic Enzymes of aspergillus sojae. Agr. Biol. Chem. Vol. 34. Nº 11, p. 1690-1696, 1970.
- (30) OSBORNE T.B., AND COMPBELL, G.F.J. Am.Chem.Soc. 419 (1898)
- (31) W.J. WOLF. Soybean protein nomenclature. - Cereal Science Today 14, 75 (1969).
- (32) NAISMITH, W.E.F. BIOCHIM-BIOPHYS. Acta 16 : 203 (1955)
- (33) HASEGOWA, K. JUSANO, T. AND MILSUDA, H. Agr. Biol. Chem. 27 : 878 (1963).
- (34) DANJI FUKUSHIMA. - Internal structure of 7 S and 11 S globulin molecules in soybean protein. cereal chemistry Vol. 45, May 1968 Nº 3.
- (35) DANJI FUKUSHIMA. -Dénaturation of soybean proteins by organic solvents. Agr. Biol. Chem. Vol. 46, March 1969.
- (36) WOLF. W.J. - Chemical and physical properties of soybean proteins. The bakers digest 36 october 1969.
- (37) CATSIMPOOLAS N. and EKENSTAM C. - Isolation of alpha, Beta and Gamma Conglycins archives of biochemistry and Biophysics 129, 490-497 (1969).
- (38) WOLF W.J. AND ALLAN SMITH. - Food uses and properties of soybean protein II. Food technology 1961, Vol. XV, Nº 5, p. 12 - 33.

- (39) N. CATSIMPOOLAS T.G. CAMPBELL AND E.W. MEYER . -
Association - Dissociation phenomena in glycinin.
Archives of biochemist. and biophysics 131, 577-
586 (1969).
- (40) Chemical and physical properties of a 7 S protein in
soybean globulins. Cereal Chem. Vol. 45. september
1968, p. 393 - 403.
- (41) ROBERTS, R.C. AND BRIGGS. D.R. - Isolation and cha-
racterization of the 7 S component of soybean glo-
bulins. Cereal Chem 42 : 71 - 85 (1965).
- (42) IKUNORI KOSHIYAMA. - Factors influencing conformation
changes in a 7 S protein of soybean globulins by
ultracentrifugal investigation. Agr. Biol. Chem.,
Vol. N° 7, p. 879 - 887, 1968.
- (43) KOSHIYAMA. - Purification of the 7 S component of soy-
bean protein. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 29 : 885 -
887 (1965).
- (44) KOSHIYAMA. - Chromatographic and sedimentation Behavior
of a purified 7 S protein in soybean globulins. Noda
institute for scientific Research, Noda-shi Chiba-Ken
Japan
- (45) WOLF W.J. AND DAGLE ANN SLY. - Cryoprecipitation of
soybean 11 S protein. Northern regional research
laboratory Peoria Illinois.
- (46) TETSUJIRA OBARA ET MIJO KIMURA.-Gel filtration frac-
tionation of the Whole Water-Extractable soybean
protein. Volume 32 (1967) journal of food science-
531.
- (47) CATSIMPOOLAS N. EKENTAM C. AND EW. MEYER. - Seperation
of soybean whey proteins by isoelectric focusing.
Central soja, chemurgy Division, Chicago Illinois
10639.

- (48) N. CATSIMPOOLAS, C. EKENSTAM AND E.W. MEYER . - Iso-
lation of the pH 4,5 soybean trypsin inhibitor by
isoelectric focusing . Biochimica and Biophysica
Acta 175 (1969) 76 - 81
- (49) L.C. WANG. - Isoelectric point differences in com-
mercial soybean trypsin inhibitors. Cereal Chemistry
May/June 1971, Vol. 48. N° 3.
- (50) YAMAMOTO. M. AND IKENAKA T. - Studies on soybean tryp-
sin inhibitors. J. Biochem 62, 141 (1967) Tokyo
- (51) BIRK. Y., GERTLER A., AND KHALEF S.A. - Pur trypsin
inhibiteur from soyabeans Biochem. J. 87 : 281 (1963).
- (52) N. CATSIMPOOLAS. D.A. ROGERS AND E.W. MEYER. - Immuno-
chemical and Disc Electrophoresis study of soybean
trypsin inhibitor SBTIA - 2. Cereal chemistry,
March 1969, Vol. 46, N° 2.-
- (53) KAZUYOSHI OKUBO AND KAZUO SHIBASAKI. - Fractionation
of main components and their subunits of soybean
proteins. Agr. Biol. Chem. Vol. 31 N° 11 p.1276 -
1282, 1967.
- (54) N. CATSIMPOOLAS. - Isoelectric Focusing in narrow pH
Gradients of Kunitz and Bowman - Birk. Soybean
Trypsin inhibitors. Separation sciences 4 (6)
pp. 483 - 492 December 1969.
- (55) WOLF W.J. AND DAYLE ANN SLY. - Cryoprecipitation of
soybean 11 S protein. Cereal Chem. Vol. 44 N° 6,
1967.
- (56) BRIGGS D.R., and mann R.L. An electrophoretic analysis
of soybean protein Cereal Chem. 27, 243.

- (57) Purification and structural studies of the II component of soybean proteins. - N. CATSIMPOOLAS, D.A. ROGERS. S.J. CIRCLE AND E.W. MEYER. - Research laboratory chemurgy Division central soja C°, Chicago Ill.U.S.A.
- (58) ELDRIGE A.C. AND WOLF W.J.- Purification of the 11 S component of soybean protein Arch Biochem. Biophys, Vol. 44 November 1967, p.642 - 652.
- (59) W.J. WOLF BABCOCK G.E., AND SMITH A.K. - Purification and stability studies of the 11 S component of soybean protein. Arch. Biochem. Biophys. 99 ; 265 -274 (1962).
- (60) MITSUDA H., KUSANO T., AND HASEGAWA K. - Purification of the 11 s component of soybean proteins. Agr. Biol. Chem. 29 ; 7 - 12 (1964).
- (61) WOLF. WIJ. AND BRIGGS D.R. Purification and characterization of 11 S component of soybean proteins. Arch. Biochem. Biophys. 85 : 186 - 199 (1959).
- (62) MANN, R.L., AND BRIGGS D.R. - Effects of solvent and heat treatments on soybean protein as evidenced by electrophoretic analysis, cereal chem. 27 : 258 - 269 (1950).
- (63) UTI COGAN, ANIMA YARON ET AL. - Effect of progressing conditions on the nutritive value of isolated soybean proteins. Agr. food. chem. Vol. 16, N° 2, Mar.- Apr. 1968.
- (64) UTI COGAN, ANIMA YARON ET AL. - Isolation of soybean protein. effect of processing conditions on Yields and purity.
The journal of the american oil Chemists Society
Vol. 44, May 1967.
- (65) CLARK. E.P. 1943 "Semi-micro quantitative inorganic analysis" p. 42. Academic press. New-York.

- (66) G. FOUILLOUGE : Chimie qualitative et quantitative appliquée : p. 302 et 389 Lyon 1951.
- (67) R.F. MILTON ET W.A. WATERS. - Methods of quantitative micro-analysis. Edward arnold publ., Londres 1955.
- (68) S.J. ROWLAND. - J. DAIRY SCI., 9 (1938) 42.
- (69) WORK T.S. AND WORK E.-Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Volume I. North-Holland publishing company. Amsterdam (1969).
- (70) MELACHOURIS N. J. DAIRY SCI. 52 (1969) 456.
- (71) R.G. WAKE AND R.L. BALDWIN. - Biochem. Bioph. Acta, 47 (1961) 225.
- (72) L. LORAND. - Biochem. J., 52 (1952), 200.
- (73) C. ALAIS, G. MOCQUOT, HS, NITSCHMANN UND P. ZAHLER. - Das lab und seine Wirkung auf das casein der Milch. VII-Über die abspaltung von nicht-protein-stickstoff (NPN) aus casein durch lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerrinnung der Milch. Helv. Chim. Acta, 36, (1953) 1955 - 1968.
- (74) C. ALAIS. - Etude des substances azotées non protéiques (NPN) séparées de la caséine du lait de vache sous l'action de la présure. C.R. XIVème Congrès Intern. Laiterie, Rome, Vol. II (1956) 823-837.
- (75) JACOBSEN C.F. - The activation of chymotrypsinogen. C.R. Labor-Carlsberg, ser. chim. 25 (1947) 327.
- (76) C. ALAIS. - Etude de l'action enzymatique de la présure sur la caséine. isolement et composition du caséino-glycopeptide. Thèse Science, Paris 1962.

- (77) C. ALAIS. - Etude de la libération de l'azote, du phosphore et de l'acide sialique non protéiques au cours de l'action de la présure sur la caséine. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 3 (1963) 391 - 404.
- (78) BECKER et al method for determining nonprotein nitrogen in soybean meal. Cereal chem. 17. 447.
- (79) On basic subunits dissociated from C (11 S) component of soybean proteins with urea. Agr. Biol. Chem., Vol. 33 N° 3, p. 463 - 465, 1969.
- (80) N. CATSIMPOOLAS. - Isolation of glycinin subunits by isoelectric focusing in urea-mercaptoethanol. FEBS letters Vol. 4 number 4 august 1969 Amsterdam.
- (81) S. ARAI, MASATOSHI NOGUCHI ET AL. - Applying proteolytic Enzyme on soybean part. VII. Agr. Biol. Chem., Vol.34 N° 9, p. 1338 - 1345, 1970.
- (82) S. ARAI, MICHIO YAMASHITA ET AL. - Applying proteolytic enzymes on soybean. part V. Agr. Biol. Chem., Vol. 34, N° 5, p. 729 - 738, 1970.
- (83) A.M. NASH AND W.J. WOLF. - Solubility and ultracentrifugal studies on soybean globulins. northern Regional Research laboratory Peoria Ill. 61604 U.S.A.
- (84) W.J. WOLF AND T. TAMURA : heat denaturation of soybean 11 S protein. Cereal Chem. Vol. 46, N° 4, july 1969.
- (85) LORIENT D., Thèse, Sciences, Nancy 1969. - Etude de la décomposition thermique des caséines.
- (86) A.C. ELDRIDGE W.J. WOLF, A.M. NASH AND A.K. SMITH. - Alcohol washing of soybean protein. Agr. and food chem. Vol II pp 323-8 July-August 1963.

- (87) A.C. ELDRIDGE, P.K. HALL AND W.J. WOLF. - Stable foams from unhydrolyzed soybean protein. Food technology, 1963. Vol. 17, N° 12, p. 120 - 123
- (88) ALLAN K. SMITH AND WALTER J. WOLF. - Food uses and properties of soybean protein I. Food technology 1961. Vol. XV N° 5, p. 4-10.
- (89) NGANSHOU WAI. - Soybean cheese. Bulletin of the institute of chemistry, academia sinica N° 9, july 1964.
- (90) Y.D. HANG AND H. JACKSON. - Preparation of soybean cheese using lactic starter organisms. Food technology 21, (1967) 95 - 96 and 97 - 100.
- (91) KYOKO SAIO, MAKOTO KAMIYA AND TOKUJI WATANABE. - Food processing characteristics of soybean 11 S and 7 S proteins. Agr. Biol. Chem., Vol. 33, N° 9 P. 1301-1308, (1969).
- (92) MACMASTERS M. M.S. WOODRUFF AND H. HLASS. - Studies on soybean carbohydrates. Ind. Eng. Chem., anal Ed. 13, 471, 1941.
- (93) N. CATSIMPOOLAS J. WANG AND T. BERG. - Spectroscopic studies on the conformation of native and denatured glycinin. Int. J. protein research III 1971, 277 - 284.
- (94) W.J. WOLF. - Soybean proteins : Their functional, chemical and physical properties Agr. and food chemistry. Vol.18 N° 6, p. 969, Nov/Dec 1970.
- (95) W.J. WOLF DAYLE ANN SLY AND W.F. KWOLEK . - Carbohydrate content of soybean proteins : cereal chemistry Vol. 43, N° 1., January 1966.
- (96) DANJI FUKUSHIMA. - Enzymatic hydrolysis of alcohol - denatured soybean protein. Central research, institute. Kikkoman Shoyu Japan.

- (97) PUSKI, G. AND MELNYCHYN P., cereal chem. 45, 192, (1968).
- (98) RAFTERY, M.A., AND COLE, R.D., Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 467 (1963).
- (98) W.J. WOLF : Chemical and physical properties of soybean protein. - Bakers digest Vol. 43, N° 5, pp. 30 - 31, 34 - 37, oct. 1969.
- (100) SMITH A.K.T. WATANABE AND A.M. NASH 1960. - Tofu from japanese and united states soybean. Food Technol. 14, 332.
- (101) **Yields of extracted solids** in soymilk as affected by temperature of water of various, pretreatments of Beans. New-York state agricultural experiment station. Department of food science .
- (102) WINSTON YAU LAI LO, K.H. STEINKRAUS D.B. HAND, W.F. WILKENS AND L.R. HACKLER : heat sterilization of bottled soymilk Food technology Vol. 22, 787, june 1969 - 1969.
- (103) R.G. WAKE ET R.L. BALDWIN. - Electrophorèse sur gel d'amidon en milieu urée. BBA. 47 (1961), 225.
- (104) ALLAN K. SMITH AND WALTER J.O. WOLF. - Food uses and properties of soybean protein. I. food technology, 1961, Vol. XV, N° 5, pages 4 - 6, 8, 10. May 1961.
-

